



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**  
**LABORATÓRIO DE VIROLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS  
NÃO DOBRADAS (UPR) NA INFECÇÃO PELO ZIKA VIRUS**

**ÂNGELA VIEIRA SERUFO**

Belo Horizonte

Junho de 2019

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS  
NÃO DOBRADAS (UPR) NA INFECÇÃO PELO ZIKA VIRUS**

**ÂNGELA VIEIRA SERUFO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientação: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Co-orientação: Dr. Thiago Lima Leão

Belo Horizonte

Junho de 2019

043 Serufo, Ângela Viera.  
Avaliação da ativação de componentes da via de resposta a proteínas não dobradas (UPR) na infecção pelo Zika Virus [manuscrito] / Ângela Viera Serufo. - 2019.

166 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca. Co-orientação: Dr. Thiago Lima Leão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Zika Vírus. 3. Resposta a Proteínas não Dobradas. 4. Reticulo endoplasmático. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Leão, Thiago Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Ângela Vieira Serufo  
Nº REGISTRO: 2015662078

Às 14 horas do dia 17 de junho de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Claudio Antonio Bonjardim, Jaqueline Germano de Oliveira, Alexandre de Magalhães Vieira Machado, Lorena Christine Ferreira da Silva e Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, para julgar o trabalho final, da aluna Ângela Vieira Serufo, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de junho de 2019. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Prof(a). Dr(a). Claudio Antonio Bonjardim \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Jaqueline Germano de Oliveira \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Alexandre de Magalhães Vieira Machado \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Lorena Christine Ferreira da Silva \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador) \_\_\_\_\_

*Betânia Rivas Diniz*  
F/ Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar tudo possível.

À minha família, pelo apoio incondicional. À minha mãe e ao meu pai, Sônia e José Carlos Serufo, meus guias, pelos grandiosos ensinamentos e por me dar a base e condições para chegar até aqui, pelo suporte e por me encorajar diariamente a perseguir meus sonhos. Aos meus irmãos, Carla e Serufinho, e minha cunhada Caroline pelo incentivo e apoio às minhas escolhas. Ao meu primo e *designer* gráfico, Gustavo Rosa, por dar estilo, cor, elegância e me ajudar intensamente em minhas apresentações.

Ao Mou, pelo apoio incondicional, pelo companheirismo, inclusive durante os infundáveis experimentos madrugada afora, finais de semana e feriados, pela paciência e carinho em todos os momentos. Por deixar tudo mais leve e divertido, mesmo nos momentos mais difíceis. Aos seus pais, Sr. João e D. Dica, pelo abrigo e carinho de sempre, pelas palavras acolhedoras a mim cedidos.

Aos colegas e amigos (as) do LVBA, bem como de outros laboratórios da UFMG e Hemominas, pelo apoio não somente nos experimentos (muito obrigada Raissa, Lethícia Henriques, Gabriela, Danielle, Sabryna, Karine, Eduarda, Silvia, Cid, Matheus, vocês foram fundamentais nisto) pelos momentos divertidos, pela amizade proporcionada. Em especial, agradeço Tania Mara por sempre ajudar e trazer todo seu conhecimento a todos do laboratório. Ao Dr. Thiago Lima Leão pelo apoio constante, pelo fornecimento de materiais e protocolos fundamentais ao estudo, pelos esclarecimentos prestados em diversas situações. Ao Laboratório de vírus, sempre disposto a colaborar, em especial à Lethícia Henriques, pela imensurável ajuda e pela compreensão num momento difícil. Aos colegas do Biomol (Faculdade de Farmácia-UFMG), em especial ao Dr. Frederico Crepaldi, Dani e Tati, pelo apoio de sempre, entre experimentos e conversas. À todos os (as) amigos (as), por trazerem alegria e confiança nos momentos de preocupação. Espero um dia poder retribuí-los pelo amor e carinho.

À todos os professores que contribuíram constantemente com ensinamentos fundamentais ao direcionamento deste estudo. Em especial, ao Prof. Aristóbolo, por me receber em seu laboratório, pela disponibilidade em elucidar e ajudar frente aos desafios; à Profa. Dra. Ana Paula Fernandes, que sempre me ajudou e esteve disponível em todas as etapas na minha carreira científica; à Profa. Dra. Edel Stancioli pelo constante apoio e ensinamentos sempre de prontidão; à Profa. Dra. Marina Martins, da Fundação Hemominas, por me receber em seu laboratório e por todo o suporte, atenção e ensinamentos transmitidos. À Profa. Dra Simone Gonçalves, pelas palavras, pelo apoio e por contribuir enormemente para meu aprendizado em docência. Ao Prof Dr. Caio Fagundes pela paciência e ajuda nas análises de citometria de fluxo. Ao Prof. Dr. Gustavo Menezes, bem como sua aluna de pós-doutorado Maisa, por permitir e auxiliar, pela disponibilidade e prestatividade em realizar as imagens de microscopia confocal e dar os esclarecimentos e suporte para este experimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio da Fonseca, pelas belíssimas e significativas orientações prestadas, pela paciência e confiança a mim destinados, pela agradável convivência, pelos conselhos que perdurarão pela vida, afinal, por permitir e contribuir para que este sonho fosse se concretizasse.

Aos membros da banca - Profa. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, Prof. Dr. Claudio Antonio Bonjardim, Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão, Dra. Lorena Christine Ferreira da Silva e Dra. Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva - por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho e pela incalculável contribuição para que este trabalho seja concluído com êxito e cumpra com seu principal objetivo de contribuir para a evolução da pesquisa. Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia/ICB/UFMG, pelo suporte e pela oportunidade e às agências de financiamento Capes, Cnpq e Fundep por tornar possível esta pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse seguir nesse estudo.

Gratidão.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO .....	16
ABSTRACT.....	18
I – INTRODUÇÃO.....	20
1. O Zika Vírus .....	22
1.1 Estrutura viral .....	22
1.2 Taxonomia e Transmissão.....	24
1.3 Epidemiologia da Zika .....	26
1.4 Ciclo de Multiplicação Viral.....	31
1.5 Manifestações clínicas .....	34
1.6 Microcefalia e ZIKV .....	35
1.7 Diagnóstico do ZIKV .....	38
1.8 Resposta Imune Inata e o <i>Zika vírus</i> .....	41
2. Via de sinalização a proteínas não dobradas (UPR) .....	46
2.1 As três vias da UPR – Os Sensores do Estresse do Retículo Endoplasmático .....	52
2.1.1 <i>Enzima 1 sequestradora de Inositol (Inositol-requiring enzyme 1) - IRE1</i> .....	52
2.1.2 Proteína Cinase Residente no Retículo Endoplasmático semelhante à PKR – PERK .....	54
2.1.3 Fator de Transcrição 6 - ATF6 .....	57
2.2 Via UPR e Infecções Virais.....	59
II – Justificativa .....	66
III – Objetivos.....	69
3. Objetivo Geral .....	70
3.1 Objetivos Específicos .....	70
IV – Materiais e Métodos .....	71
4. Desenho do estudo .....	72
4.1 Amostra Viral .....	72
4.2 Plasmídeos .....	72
4.3 Células.....	73
4.4 Iniciadores.....	74
4.5 Delineamento experimental .....	75
5 MÉTODOS.....	76
5. 1 OBTENÇÃO DO ESTOQUE VIRAL E CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DO VIRUS ZIKA EM CÉLULAS T98G.....	76
5.1.1 Obtenção do <i>ZIKV</i> em células C6 36 .....	76
5.1.2 Cultivo celular das linhagens Vero e T98G.....	76

5.1.3 Infecção em células T98G .....	77
5.1.4 Detecção da infecção de células T98G por curva de multiplicação .....	78
5.1.5 Detecção da infecção de células T98G por ensaio de imunomarcção com anticorpos <i>anti-flavivírus</i> .....	79
5.2 ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO ATF6 DA VIA UPR.....	79
5.2.1 Ensaio da atividade transcricional de ATF6 em células T98G infectadas por <i>ZIKV</i> .....	79
5.2.2 Detecção da translocação de ATF6-GFP em células T98G infectadas por <i>ZIKV</i> .....	81
5.3 ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO IRE1/XBP1 DA VIA UPR .....	85
5.3.1 Análise do processamento de XBP1 por RFLP .....	86
5.3.2 Análise do processamento de XBP1 por PCR quantitativo .....	87
5.4 ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO PERK DA VIA UPR em ensaio de RT-qPCR.....	88
5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CHAPERONAS EM CÉLULAS INFECTADAS POR <i>ZIKV</i> .....	89
5.5.1 Análises da produção gênica de BiP/GRP78 por qPCR .....	89
5.5.2 Análises da expressão das proteínas BiP/GRP78 e Calregulina por citometria de fluxo .....	90
5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DA VIA UPR: MATRIZ DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QUANTITATIVE REAL TIME-PCR ARRAY) .....	92
V - Resultados e discussão.....	94
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DO VIRUS ZIKA EM CÉLULAS T98G .....	95
6.1.1 Detecção da infecção de células T98G por curva de multiplicação .....	95
6.1.2 Detecção da infecção de células T98G por ensaio de imunomarcção com anticorpos <i>anti-flavivírus</i> .....	97
6.1.3 Detecção da infecção de células T98G por ensaio de RT-qPCR .....	98
6.1.4 Detecção da infecção de células T98G no ensaio de Citometria de Fluxo.....	100
6.2 EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO ATF6 DA VIA UPR.....	103
6.2.1 Ativação de ATF6-GFP em células T98G infectadas por <i>ZIKV</i> .....	103
6.2.2 Atividade transcricional de ATF6 em células T98G infectadas por <i>ZIKV</i> .....	109
6.2.3 Expressão de genes do braço ATF6 em ensaio de matriz de PCR quantitativa em tempo real ( <i>Quantitative real time-pcr array</i> ) .....	111
6.3 EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO IRE1/XBP1 DA VIA UPR.....	114
6.3.1 Processamento do RNA mensageiro de XBP1 por IRE1 .....	114
6.3.2 Expressão de genes do braço IRE1 em ensaio de matriz de PCR quantitativa em tempo real ( <i>Quantitative real time-pcr array</i> ) .....	117
6.4 EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO PERK DA VIA UPR.....	120
6.4.1 Expressão de genes a jusante do braço PERK na infecção por <i>ZIKV</i> .....	120

6.4.2 Expressão de genes do braço PERK em ensaio de matriz de PCR quantitativa em tempo real (Quantitative real time-pcr array) .....	123
6.5 PRODUÇÃO DE CHAPERONAS EM CÉLULAS INFECTADAS POR ZIKV .....	128
6.6 PERFIL DE EXPRESSÃO DE mRNA DA UPR EM CÉLULAS INFECTADAS POR ZIKV EM ENSAIO DE MATRIZ DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL ( <i>QUANTITATIVE REAL TIME-PCR ARRAY</i> ).....	133
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	149
8 CONCLUSÕES.....	150
9. ANEXOS .....	151
VI – Referências Bibliográficas.....	152

## Lista de Abreviaturas

°C – graus Celsius

µg – microgramas

µL – microlitros

**AIM2** - *Interferon-inducible protein*

**ATF6** - Fator de Transcrição 6

**BiP** - *Binding Protein, HSPA5 - heat shock 70 kDa protein 5 ou GRP78 - glucose responsive protein*

**BSA** – albumina de soro bovino

**BVDV** - vírus da diarreia viral bovina

**CDC** – *Center for Disease Control*

**cDNA** – DNA complementar

**CHOP** - proteína homóloga do fator de transcrição C/EBP

**cm** – centímetro

**CMV** - Citomegalovírus

**CSFV** - vírus da peste suína clássica

**CT** - *Threshold Cycle* (número de ciclos)

**DAPI** - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

**DC-SIGN** – *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin*

**DENV** – *Dengue virus*

**DNA** – ácido desoxiribonucleico

**DO** – densidade óptica

**ECDC** - *Europe Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças)

**ELF2** - fator de iniciação de tradução eucariótico 2

**ELISA** – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

**ERAD** - sistema de degradação associado ao RE

**ERO1** - *Endoplasmic Reticulum Oxidase family member* (Membro da família oxidase do retículo endoplasmático)

**g** – gramas

**g** – unidade de aceleração

**HCl** – ácido clorídrico

**HCV** – vírus da Hepatite C

**HIS** – histidina

**hpi** – horas após infecção

**hNPCs** – células progenitoras neurais humanas

**IC** – Intervalo de confiança

**ICTV** – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

**IFAT** – ensaio de imunofluorescência de anticorpos

**IFN** – interferon

**IFN-1** – interferon do tipo 1

**Ig** – imunoglobulina

**IL** – interleucina

**IL-1** – Interleucina 1

**IPTG** – *isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo*

**IRE1** - *Inositol-requiring enzyme 1* (Enzima 1 sequestradora de Inositol)

**IRF** - Fator de regulação de interferon

**JEV** – vírus da encefalite japonesa

**kDa** – kiloDaltons

**L** – Litro

**LB** – Meio *Luria-Bertani*  
**M** – Molar (unidade de concentração)  
**MDA-5** - *Melanoma differentiation-associated protein 5*  
**mg** – Miligrama  
**mL** – Mililitos  
**mM** – Milimolar  
**M.O.I.** - Multiplicidade de Infecção  
**mRNA** – RNA mensageiro  
**MS** – Ministério da Saúde  
**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Fosfato Dihidrogenado de Sódio  
**NF-κB** - Fator Nuclear Kappa B  
**NK** - *Natural killers*  
**nm** – Nanômetros  
**NS** – Proteína não estrutural  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**PAGE** – *Polyacrylamide gel electrophoresis*  
**PAMPs** - Padrões moleculares associados a patógenos  
**pb** – Pares de bases  
**PBS** – *Phosphate-buffered saline* (Solução salina tamponada)  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PDI** - Proteína Dissulfeto Isomerase  
**PERK** - Proteína Cinase Residente no Retículo Endoplasmático semelhante à PKR  
**pH** – potencial de hidrogênio  
**PRNT** - ensaio de neutralização por redução de placas  
**PRR** - receptores de reconhecimento de patógenos  
**RT-qPCR** – *Real Time Quantitative PCR* (PCR quantitativo em tempo real)  
**RE** – Retículo Endoplasmático  
**RFLP** - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição  
**RLRs** - *RIG-like receptors*  
**RIG-1** - *retinoic acid-inducible gene 1*  
**RNA** – ácido ribonucleico  
**RPM** – rotações por minuto  
**SCVZ** - Síndrome congênita do vírus Zika  
**SDS** – Dodecilsulfato de sódio  
**SE** – Semana epidemiológica  
**SGB** – Síndrome *Guillain-Barré*  
**SFB** - soro fetal bovino  
**TAM** – família de receptores da tirosina-quinase  
**TBEV** - *Tick-borne encephalitis*  
**TEMED** – Tetrametildiamina  
**TLR3** - *Toll-like receptor 3*  
**Tris** – Tris(hidroximetil)aminometano  
**Ufs** – Unidades Federativas  
**ufp** – unidades formadoras de placa  
**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais  
**UPR** - *Unfolded Protein Response* (Resposta a proteínas não dobradas)  
**UTR** - *Untranslated region*  
**UV** – Ultravioleta  
**V** – Volt (unidade de tensão elétrica)

**VLP** - Virus-like Particles.

**WB** – *Western Blot*

**WNV** - *West Nile virus*

**YFV** - *Yellow fever virus*

**ZIKV** – *Zika virus*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Genoma do vírus Zika. ....	23
Figura 2: Estrutura da partícula viral de Zika vírus. ....	24
Figura 3: Ciclo de transmissão do Zika vírus. ....	25
Figura 4: Linha cronológica de áreas de relatos de infecções por vírus Zika em seres humanos ocorridas após o surto de 2007, em Yap (Micronésia), até de março de 2016. Fonte: PETERSEN <i>et al.</i> , 2016 .....	28
Figura 5: Incidência de casos prováveis pelo vírus Zika no Brasil em 2017 e 2018. ....	30
Figura 6: Ciclo de multiplicação do Zika vírus. ....	33
Figura 7: Indicação para o diagnóstico de ZIKV segundo dia de início dos sintomas e tipo de amostra....	39
Figura 8: Vias de Resposta de TLR3, RIG-1 e MDA-5 na infecção por flavivirus. ....	44
Figura 9: Os três braços da resposta a UPR. ....	47
Figura 10: Os três braços da UPR (PERK, ATF6, IRE1) e ativação por vírus. ....	60
Figura 11: Delineamento experimental. ....	75
Figura 12: Representação esquemática do ensaio do gene reporter da luciferase. ....	80
Figura 13: Mapa completo da sequência Addgene para pEGFP-ATF6. ....	82
Figura 14: Eficiência da infecção de células T98G pelo ZIKV AS ou ZIKV AF em ensaio de curva de multiplicação. ....	96
Figura 15: Visualização da infecção das células T98G por ZIKV AS ou ZIKV AF em microscopia de fluorescência. ....	97
Figura 16: Curva de padronização para quantificação de RNA de ZIKV. ....	99
Figura 17: Expressão do RNA mensageiro de ZIKV AS em células T98G infectadas. ....	100
Figura 18: Detecção do ZIKV pela marcação da proteína E do envelope viral. ....	101
Figura 19: Microscopia de fluorescência da translocação de ATF6-EGFP para o núcleo. ....	104
Figura 20: Células T98G não infectadas (mock) transfectadas com ATF6-EGFP. ....	105
Figura 21: Células T98G tratadas com Tunicamicina e transfectadas com ATF6-EGFP.....	106
Figura 22: Análise da translocação de ATF6 para o núcleo celular em células T98G na infecção pelo ZIKV AF.....	107
Figura 23: Análise da translocação de ATF6 para o núcleo celular em células T98G na infecção pelo ZIKV AS.....	108
Figura 24: Ensaio do gene repórter da Luciferase para detecção da ativação transcricional de ATF6 na infecção pelo ZIKV AS ou ZIKV AF em células T98G.....	109
Figura 25: Ensaio do gene repórter da Luciferase para detecção da ativação transcricional de ATF6 na infecção pelo ZIKAS em células T98G em intervalos de tempos hpi. ....	111
Figura 26: Expressão de genes do braço ATF6 da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS. ....	112
Figura 27: Processamento do mRNA de XBP1 por IRE1 na infecção por ZIKV AS. ....	115
Figura 28: Processamento do mRNA de XBP1 por IRE1 na infecção por ZIKV AF. ....	116

Figura 29: Expressão de genes do braço IRE1 da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS. ....	118
Figura 30: Expressão relativa do gene ATF4 do braço PERK da via UPR na infecção de células T98G pelo vírus Zika.....	121
Figura 31: Expressão relativa do gene CHOP do braço PERK da via UPR na infecção de células T98G pelo vírus Zika.....	122
Figura 32: Expressão de genes do braço PERK da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS. ....	124
Figura 33: Histogramas bivariados de dot plot ilustrando a seleção de gates para determinação da subpopulação de células T98G infectadas por ZIKV AS ou ZIK AF para marcação das chaperonas BiP e Calregulina.....	129
Figura 34: Expressão proteica das chaperonas BiP e Calregulina, na infecção pelo Zika vírus em células T98G. ....	130
Figura 35: Expressão relativa do gene da chaperona BiP/GRP78 na infecção de células T98G pelo vírus Zika. ....	132
Figura 36: Expressão de genes da via UPR em células T98G infectadas pelo ZIKV AS em relação ao controle de células não infectadas. ....	141
Figura 37: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes reguladores da tradução. ....	142
Figura 38: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes de dobramento de proteínas. ....	143
Figura 39: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes de Proteínas Heat Shock.....	144
Figura 40: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes de Ubiquitinação e genes do grupo de degradação associado ao retículo (ERAD). ....	145
Figura 41: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes grupo de Apoptose. ....	146
Figura 42: Expressão de genes dos três sensores da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS. .	147

#### LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Plasmídeos utilizados no estudo.....	67
Quadro 2: Células utilizadas no estudo.....	68
Quadro 3: Valores de CT e média geométrica dos Genes de expressão constitutiva, utilizados como normalizadores do ensaio de qRT-PCR array, de acordo com o grupo com os grupos estudados de células infectadas (24, 48 e 72 hpi) e não infectadas (Mock).....	128

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação e sequência dos iniciadores .....	69
Tabela 2: Análise da expressão gênica em células T98G infectadas com ZIKV AS.....	129/131
Tabela 3: Relação dos genes que tiveram expressão aumentada (à esquerda) ou diminuída (à direita) em células T98G infectadas com ZIKV AS em 24 horas após a infecção.....	132

Tabela 4: Relação dos genes que tiveram expressão aumentada (à esquerda) ou diminuída (à direita) em células T98G infectadas com ZIKV AS em 48 horas após a infecção.....132

Tabela 5: Relação dos genes que tiveram expressão aumentada (à esquerda) ou diminuída (à direita) em células T98G infectadas com ZIKV AS em 24 horas após a infecção.....133/134

## RESUMO

O *Zika vírus* (ZIKV), do gênero *Flavivirus*, é o agente causador de uma doença infecciosa emergente em muitos países, com elevado número de casos reportados nos últimos anos e forte associação causal com síndromes neurológicas graves. O entendimento sobre o comportamento do vírus no organismo é de suma importância para o desenvolvimento de mecanismos de contenção da doença, para a condução de um tratamento adequado e instauração de medidas preventivas.

Os vírus evoluíram numerosas estratégias para manipular as respostas do hospedeiro e garantir o seu sucesso replicativo. Durante a replicação viral ocorre elevada produção e modificações pós traducionais de proteínas virais no retículo endoplasmático (RE) das células hospedeiras, o que resulta na sobrecarga do sistema de processamento de proteínas da organela e, conseqüentemente, ativa uma via de resposta a proteínas não dobradas (UPR). Essa resposta é coordenada pelos sensores IRE1, PERK e ATF6 acoplados à membrana do RE que são responsáveis por monitorar a transcrição de genes e a tradução de proteínas envolvidas no controle da UPR.

Este trabalho aborda o efeito da infecção por ZIKV sobre a ativação de componentes da via UPR em células de glioblastomas neuronais humanas T98G. A infecção dessas células por ZIKV mostrou regulação negativa de ATF6, em ensaios de microscopia de fluorescência e microscopia confocal, bem como a não ativação da atividade transcricional de ATF6 em ensaio de gene repórter da luciferase. Ainda, a expressão de genes ativados por ATF6, XBP1 e CHOP, não tiveram elevação durante a infecção pelo ZIKV. O sensor IRE1 avaliado em ensaio que monitorou o processamento do seu substrato, o mRNA do fator de transcrição XBP1, mostrou modulação dependente do tempo de infecção, com regulação negativa até 48 horas após a infecção. A expressão de genes ativados por XBP1, como EDEM1, foi ativada em 72 horas após a infecção, o que sugere ativação tardia deste sensor. A infecção por ZIKV induziu menor expressão de genes da via PERK, como ATF4, CHOP e GADD34, em estágios iniciais da infecção, ou seja, a ativação da expressão destes genes ocorreu após 72 horas para ZIKV asiática. Já ensaio com amostra africana de ZIKV induziu expressão de CHOP mais precoce, em 48 horas após a infecção. A expressão de 84 genes da via de UPR em infecção com ZIKV

asiática, em ensaio de matriz de PCR quantitativo em tempo real, no geral, aumentou de forma expressiva em fases mais tardias da infecção. A avaliação da produção das chaperonas BIP e calregulina foi elevada somente na infecção por ZIKV africana.

Nossos achados mostraram que o ZIKV é capaz de modular de forma distinta os componentes da via UPR, regulando negativamente ATF6, até estágios tardios e IRE1 e PERK apenas em estágios iniciais da infecção, com ativação da via de resposta ao estresse do RE com maior intensidade na fase mais tardia da infecção.

**Palavras-chave: Zika Vírus, estresse celular, resposta a proteínas não dobradas, UPR, IRE1, ATF6, PERK.**

## ABSTRACT

Zika virus (ZIKV), of the genus *Flavivirus*, is the causative agent of an emerging infectious disease in many countries, with a high number of cases reported in recent years and a strong causal association with severe neurological syndromes. Understanding the behavior of the virus in the body is of paramount importance for the development of mechanisms to contain the disease, to conduct appropriate treatment and to introduce preventive measures.

Viruses have evolved numerous strategies to manipulate host responses and ensure their replicative success. During viral replication there occurs high production and post-translational modifications of viral proteins in the endoplasmic reticulum (ER) of the host cells, which results in the overload of the organelle protein processing system and, consequently, activates an unfolded protein response pathway (UPR). This response is coordinated by the IRE1, PERK and ATF6 sensors coupled to the ER membrane which are responsible for monitoring gene transcription and translation of proteins involved in UPR control.

This work addresses the effect of ZIKV infection on the activation of UPR pathway components in T98G human neuronal glioblastomas cells. The infection of these cells by ZIKV showed negative regulation of ATF6 in fluorescence microscopy and confocal microscopy assays, as well as the nonactivation of the transcriptional activity of ATF6 in a luciferase reporter gene assay. Furthermore, the expression of ATF6, XBP1, and CHOP-activated genes did not show elevation during ZIKV infection. The IRE1 sensor evaluated in the assay that monitored the processing of its substrate, the transcription factor mRNA XBP1, showed time-dependent modulation of infection, with down-regulation up to 48 hours post-infection. Expression of XBP1-activated genes, such as EDEM1, was activated within 72 hours of infection, suggesting late activation of this sensor. ZIKV infection induced lower gene expression of the PERK pathway, such as ATF4, CHOP, and GADD34, in the early stages of infection, ie activation of the expression of these genes occurred after 72 hours for Asian ZIKV. Already, an African sample of ZIKV assay induced earlier CHOP expression at 48 post-infection. Expression of 84 UPR pathway genes in infection with Asian ZIKV in a quantitative real-time PCR

matrix assay generally increased significantly in later stages of infection. Evaluation of the production of BIP and calregulin chaperones was high only in infection with African ZIKV.

Our findings showed that the ZIKV is capable of modulating UPR pathway components negatively, regulating ATF6 to late stages and IRE1 and PERK only in the early stages of infection, with the activation of the ER response pathway with greater intensity in the later phase of infection.

**Keywords: Zika Virus, cellular stress, Unfolded Protein Response, UPR, IRE1, ATF6, PERK.**

## I – INTRODUÇÃO



O *Zika vírus* (ZIKV) é um *arbovírus*, pertencente ao reino Riboviria, família *Flaviviridae* (do latim *Flavus*, amarelo) e gênero *Flavivirus* (KUNO *et al.*, 1998; LANCIOTTI *et al.*, 2008; GORBALENYA, *et al.*, 2018; ICTV, 2018), sendo o causador da Zika ou Febre Zika. O vírus recebeu esta denominação devido ao local de origem de sua identificação em macacos na floresta Ziika, em Uganda na África, em 1947 (DICK *et al.*, 1952).

Durante muitos anos a doença circulou silenciosamente pelos continentes africano e asiático, devido apresentação clínica ser semelhante a outras doenças virais. Entre 1951 a 1981, evidências sorológicas de infecção por ZIKV foram registradas em países africanos e em partes da Ásia (ROBIN & MOUCHET, 1975; JAN *et al.*, 1978; OLSON *et al.*, 1981; SALUZZO *et al.*, 1981; SALUZZO *et al.*, 1982). A primeira epidemia descrita foi em 2007, na Micronésia, mais especificamente no estado de Yap, quando quase 75% da população esteve sob suspeita de estar infectada pelo ZIKV (DUFFY *et al.*, 2009; PAHO, 2015a). Em 2013, foi confirmada a presença do vírus nas ilhas da Polinésia Francesa, que no ano seguinte logo se espalhou para Nova Caledônia, Ilhas Cook, e Ilha de Páscoa (CAO-LORMEAU, 2014; MUSSO *et al.*, 2014a). Neste contexto, foi feita pela primeira vez a sua associação a um tipo de complicação neurológica, denominada síndrome de *Guillain-Barré* (SGB), quando foi descrito um caso de SGB ocorrido imediatamente após infecção por ZIKV, em uma co-epidemia de Zika e Dengue (OEHLER *et al.*, 2014).

Em 2015, foram identificados os primeiros casos autóctones das Américas, no Brasil, em que a presença do vírus foi confirmada pela detecção do ácido ribonucleico do ZIKV em amostras de sangue de pacientes com sintomas comuns aos apresentados por pacientes infectados por *Dengue vírus* (CAMPOS *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015). No próximo ano, foi constatada a incidência de mais de um milhão de casos de ZIKV e, além do aumento dos casos de neuropatias periféricas, dentre elas a SGB, o aumento da ocorrência de casos de microcefalia congênita (BARCELLOS *et al.*, 2016; CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; MS, 2016a; WHO, 2016c).

Vários estudos demonstraram a associação de ZIKV e microcefalia através da detecção do vírus em amostras de líquido amniótico de gestantes e em amostras de sangue de recém-nascidos diagnosticados com malformação congênita, bem como com outras

anormalidades como insuficiência placentária, restrição de crescimento e morte fetal, comprovando a possibilidade de transmissão vertical (BRASIL, 2016; CALVET *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016).

O crescente número de registros de infecções por ZIKV em várias regiões do mundo nos últimos anos e em vista da expansão geográfica da doença neste período e sua associação a complicações neurológicas graves, levou a OMS a declarar a febre por Zika vírus uma emergência de saúde pública internacional (GATHERER & KOHL, 2016; WHO, 2016a). Apesar dos esforços para o melhor entendimento deste vírus, os mecanismos pelos quais o ZIKV controla a infecção e sua permanência nas células não estão totalmente esclarecidos. Portanto, são necessários estudos que somem e esclareçam a biologia do ZIKV e possibilitem conceber estratégias que visem interferir com a patologia causada por este flavivírus.

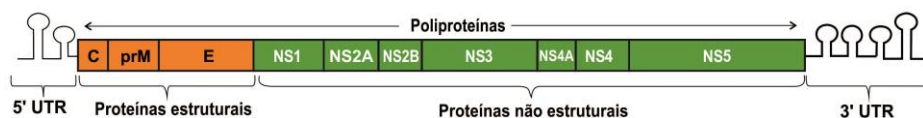
## **1. O Zika Vírus**

### **1.1 Estrutura viral**

Tal como outros membros do gênero *Flavivírus*, os *Zika virus* são envelopados e contêm um genoma de RNA de cadeia simples de sentido positivo (ssRNA) com de cerca de 11 kilobases que é traduzido como uma única poliproteína, posteriormente, clivada por proteases virais ou do hospedeiro em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (NS) (LINDENBACH *et al.*, 2013). O genoma do ZIKV possui regiões não traduzidas de circularização do ácido nucleico em suas extremidades 5' e 3', as quais tem sido relacionadas com fundamental importância para a replicação viral (VILLORDO & GAMARNIK, 2009; ALVAREZ *et al.*, 2005). Este tipo de estrutura secundária, comum em flavivírus, como o DENV, leva à formação de um RNA subgenômico, que possui papel importante também no controle da atividade antiviral, como na inibição do receptor RIG-I do hospedeiro e consequentemente, da produção de interferon (PIJLMAN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010; MANOKARAN *et al.*, 2015).

A poliproteína (Figura 1) formada possui 3.419 aminoácidos e clivada por proteases dá origem às proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (105 aminoácidos), a proteína

precursora de membrana ou prM (187 aa) e a proteína do envelope ou E (505 aa) que contém um motivo de glicosilação do envelope-154 associado à virulência (HADDOW *et al.*, 2012; FAYE *et al.*, 2014); e às sete proteínas não estruturais NS1 (352 aa) NS2A (217 aa), NS2B (139aa), NS3 (619aa), NS4A (127aa), NS4B (255aa) e NS5 (904aa) que estão envolvidas na replicação, montagem e antagonização da resposta inata do hospedeiro à infecção. Entre as proteínas NS destacam-se uma RNA-polimerase dependente de RNA (NS5) e uma helicase/protease (NS3) (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH & RICE, 2003; KUNO *et al.*, 2007; LINDENBACH *et al.*, 2013; SIROHI *et al.*, 2016). Um estudo genético feito por LANCIOTTI e colaboradores (2008) analisou as sequências nucleotídicas do gene da proteína NS5 e identificou duas amostras de origem africana e uma amostra de origem asiática. No Brasil, estudo feito em sequenciamento genômico de ZIKV isolado de casos autóctones verificou 97-100% de similaridade com a amostra originada da Polinésia Francesa (CALVET *et al.*, 2016).

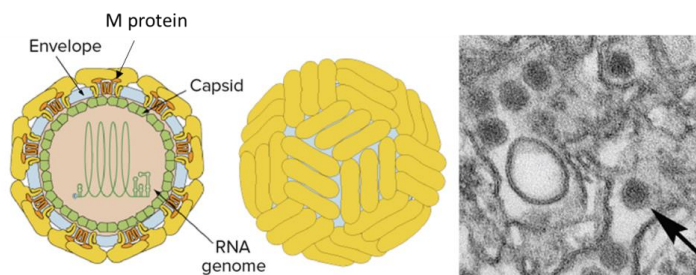


**Figura 1: Genoma do vírus Zika.**

O genoma do vírus Zika codifica três proteínas estruturais (capsídeo [C], membrana [M] e envelope [E]) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: Adaptado de BASU & TUMBAN, 2016.

As partículas virais possuem simetria icosaédrica e formato esférico, de 42-52 nm de diâmetro (Figura 2). Entre as proteínas estruturais, o nucleocapsídeo do ZIKV é formado pela proteína C associada à molécula de RNA de cadeia simples de sentido positivo. O envelope é formado por uma bicamada lipídica onde são incorporadas unidades de glicoproteínas, E e M, que estão envolvidas na ligação a vários tipos de receptores celulares (LINDENBACH & RICE, 2003; PERERA-LECOIN *et al.*, 2014; SIROHI *et al.*, 2016). A glicoproteína E contém três domínios e apenas um local de glicosilação (Asn154) que aparece como uma pequena projeção na superfície do vírus (SIROHI *et al.*, 2016). A presença de locais de glicosilação tem sido associada a danos neurológicos em cepas asiáticas causadoras da SGB e microcefalia (FAYE *et al.*, 2014), bem como à capacidade do vírus de infectar espécies específicas de mosquitos (HADDOW *et al.*,

2012). Além disso, a glicoproteína E presente na superfície de flavivírus possui papel importante para a entrada do vírus na célula, estando envolvida na interação com receptores das células do hospedeiro, para a fusão da bicamada lipídica do vírus à membrana da vesícula endossômica e na dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (CHANG, 1997; LINDENBACH & RICE, 2003; CLYDE *et al.*, 2006; HEINZ & STIASNY, 2006).



**Figura 2: Estrutura da partícula viral de Zika vírus.**

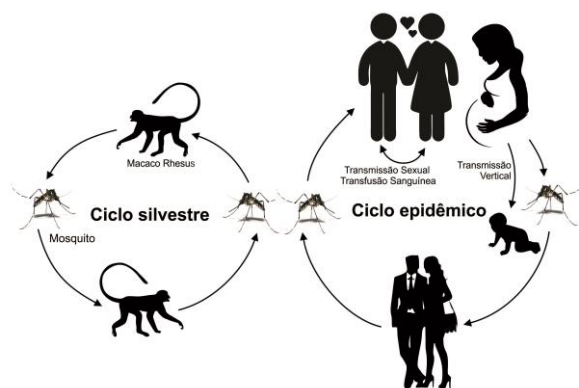
À esquerda desenho da estrutura da partícula de Zika vírus. A estrutura é composta pelo material genômico formado por RNA de fita simples e polaridade positiva (*RNA genome*) envolto pelas três proteínas estruturais: a proteína do envelope disposta em dímeros (*Envelope*); a proteína associada à membrana (*M protein*) e a proteína do nucleocapsídeo (*Capsid*). À direita, Microscopia de transmissão eletrônica (TEM) do vírus Zika. As partículas virais têm 42-52nm de diâmetro, com um envelope exterior e um núcleo denso interior. A seta identifica uma única partícula de vírus. Fonte: Adaptado de "Zika virus: Virion," por ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics (CC BY-NC 4.0); direita, "Zika virus," por C. Goldsmith, CDC Public Health Image Library.

## 1.2 Taxonomia e Transmissão

A família *Flaviviridae* subdivide-se em quatro gêneros: O gênero *Flavivirus*, composto por 53 espécies virais, que além do *Zika vírus* (ZIKV) inclui outros patógenos de importância médica como o *Dengue vírus* (DENV), o vírus da Febre Amarela (*Yellow fever virus*, YFV), o vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*, JEV) e o vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus*, WNV); o gênero *Hepacivirus*, cujo principal representante é o vírus da Hepatite C (HCV); o gênero *Pegivirus*, composto por 11 espécies, algumas podem ser detectadas em mamíferos (humanos, primatas não humanos, porcos, cavalos, roedores e morcegos) no entanto, não são consideradas

patogênicos em humanos; e o gênero *Pestivirus*, composto por 4 espécies virais, o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), todas de interesse veterinário, completam a família (ICTV, 2018). Os vírus da família *Flaviviridae* conservam características de morfologia da partícula viral, organização do genoma e estratégias de multiplicação similares, contudo albergam propriedades biológicas características e hospedeiros diversos (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A maioria dos vírus desta família é transmitida por picadas de mosquito ou de carrapato. Entre as espécies conhecidas de *Flavivirus*, as 27 transmitidas por mosquitos são subdivididas em dois grandes grupos, de acordo com sua ecologia e manifestações clínicas em humanos (KRAMER & EBEL, 2003), os *flavivirus* encefalíticos, transmitidos por mosquitos do gênero *Culex* e tendo como hospedeiros naturais os pássaros, e os *flavivirus* viscerotrópicos, que incluem o vírus da dengue e da febre amarela, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, possuindo primatas como seus hospedeiros naturais (GUBLER, 2002). A transmissão do ZIKV ocorre principalmente através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes* (Figura 3). Contudo, a detecção do vírus em amostras de urina, esperma, saliva, sangue, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, sugerem a possibilidade de outras vias de transmissão transmissão vertical, como transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (MUSSO *et al.*, 2015a; MUSSO *et al.*, 2015b; GOURINAT *et al.*, 2015; ATKINSON *et al.*, 2016; Bonaldo *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016; JURADO *et al.*, 2016; MARANO *et al.*, 2016; OLSON *et al.*, 2016).



**Figura 3: Ciclo de transmissão do Zika vírus.**

O Zika vírus é transmitido em ambiente silvestre por mosquito para primatas não humanos. Humanos podem ser infectados com o vírus em habitats silvestres através da picada do mosquito infectado e

infectar novos mosquitos em áreas rurais ou urbanas, dando origem ao ciclo epidêmico. Os vírus podem ser transmitidos de uma pessoa infectada para mosquitos, estes infectarão novos humanos dando continuidade ao ciclo. No organismo, o vírus se reproduz e dissemina e pode ser transmitido por via sexual ou por transplantes de órgãos. Mulheres grávidas também podem transmitir o vírus para o feto durante a gestação. Fonte: Adaptado de BASU & TUMBAN, 2016.

### 1.3 Epidemiologia da Zika

A primeira evidência de infecção humana por ZIKV foi em 1952, quando foi detectada a presença de anticorpos neutralizantes em soros humanos coletados na África (SMITHBURN, 1952). Até o primeiro surto ser registrado em 2007, no Estado de Yap (Micronésia), casos esporádicos naturalmente adquiridos foram relatados, sendo que as notificações acerca de circulação do vírus Zika eram restritas à África tropical e ao Sudeste Asiático (MACNAMARA, 1954; SIMPSON, 1964; MOORE *et al.*, 1975; FAGBAMI, 1979; OLSON *et al.*, 1981). O surto de 2007 na Ilha Yap, Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009), foi o primeiro identificado dessas regiões. Após isso, vários surtos significativos foram registrados em ilhas e arquipélagos na região do Pacífico, seguido pelo espalhamento mundial (Figura 4). Entre 2013 e 2014, na Polinésia Francesa, foi estimado em 19.000 o número de casos suspeitos. Destes, o RNA viral foi detectado por RT-PCR para ZIKV em 294 amostras, de 584 analisadas (CAO-LORMEAU, 2014; ECDC, 2014). Neste mesmo contexto também foi observado um aumento em torno de vinte vezes no número de casos de SGB (OEHLER *et al.*, 2014). Ainda em 2014, foram descritos novos surtos em outras ilhas do Pacífico, como Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e Ilhas Cook (DUPONT-ROUZEYROL *et al.*, 2014; ROTH *et al.*, 2014; TOGNARELLI *et al.*, 2014). No mesmo período em algumas regiões como Tailândia, East Malaysia, Camboja, Filipinas e Indonésia casos esporádicos de infecção pelo vírus Zika foram relatados (HEANG *et al.*, 2012; KWONG *et al.*, 2013; ALERA *et al.*, 2015; TAPPE *et al.*, 2014; BUATHONG *et al.*, 2015; TAPPE *et al.*, 2015; PERKASA *et al.*, 2016). Nas Américas, no mesmo ano, os primeiros relatos de infecção autóctone pelo ZIKV, na Ilha de Páscoa (Chile). Um estudo feito por *Tognarelli e colaboradores* (2016) detectou o RNA do ZIKV em 51 amostras de um total de 89 amostras de casos suspeitos de Zika. Em 2015, o vírus foi detectado em outros países da América do Sul, 25 países e territórios relataram transmissão

autóctone do vírus até fevereiro de 2016, inclusive no Brasil foi confirmada laboratorialmente em vários estudos. No período de outubro de 2015 a março de 2016, na Colômbia foram confirmados 2.090 casos entre mais de 50 mil casos suspeitos de ZIKV (CAMPOS *et al.*, 2015; LANCIOTTI *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015; MUSSO & GUBLER, 2016; WHO, 2016a). De acordo com o *Europe Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) foram registrados casos de transmissão autóctone em várias regiões das Américas, Ásia e África; como Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Cuba, Estados Unidos da América, Equador, Guiné-Bissau, Haiti, Honduras, Indonésia, Jamaica, México, Venezuela, entre outras (ECDC, 2017).

Até setembro de 2016, 1.557 casos importados de Zika foram reportados em 19 países da União Europeia (Áustria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Finlândia, França, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Malta, Holanda, Noruega, Portugal, Romênia, Eslovênia, Eslováquia, Espanha, Suíça e Reino Unido).

Até fevereiro de 2017, a transmissão do vírus Zika foi documentada num total de 76 países e territórios, entre os quais 13 relataram transmissão de pessoa a pessoa do vírus, provavelmente por via sexual (WHO, 2016a; WHO, 2016d; ECDC, 2017).

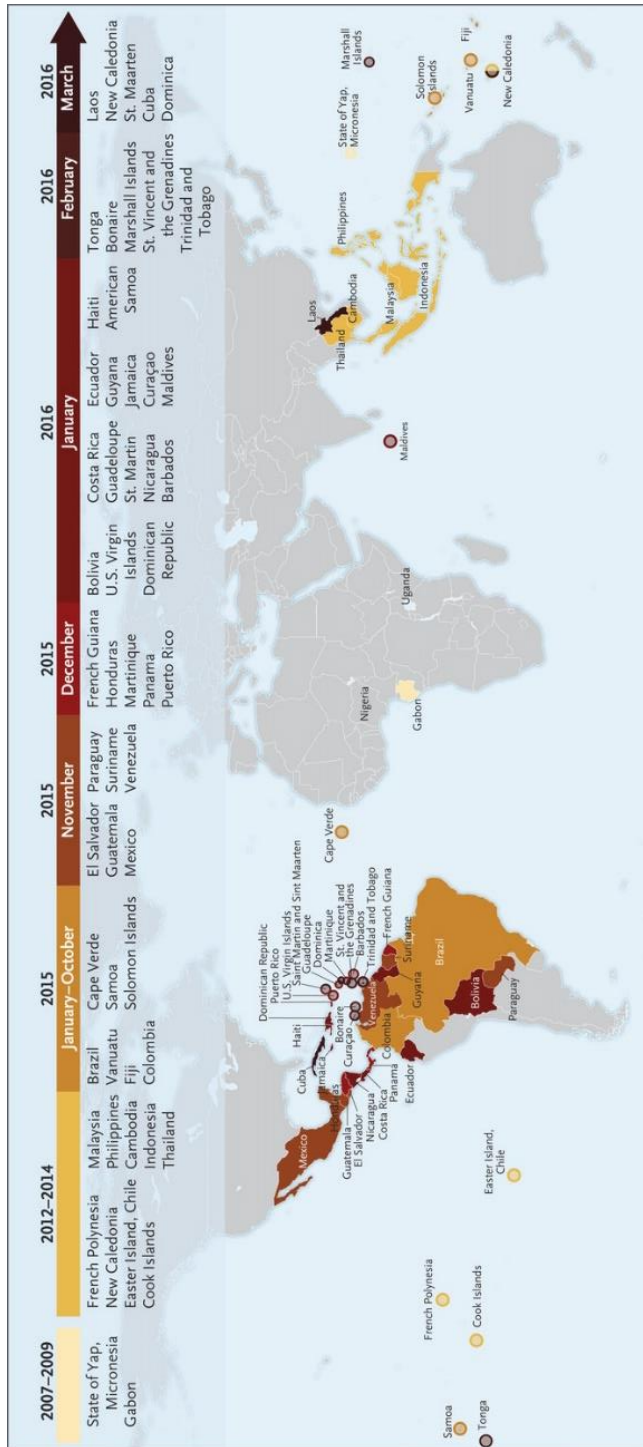
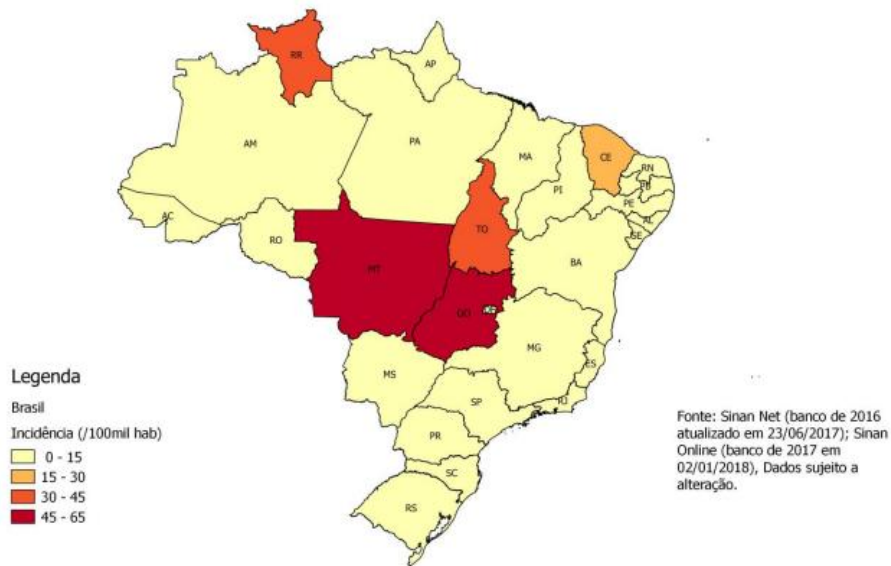


Figura 4: Linha cronológica de áreas de relatos de infecções por vírus Zika em seres humanos ocorridas após o surto de 2007, em Yap (Micronésia), até de março de 2016. Fonte: PETERSEN *et al.*, 2016

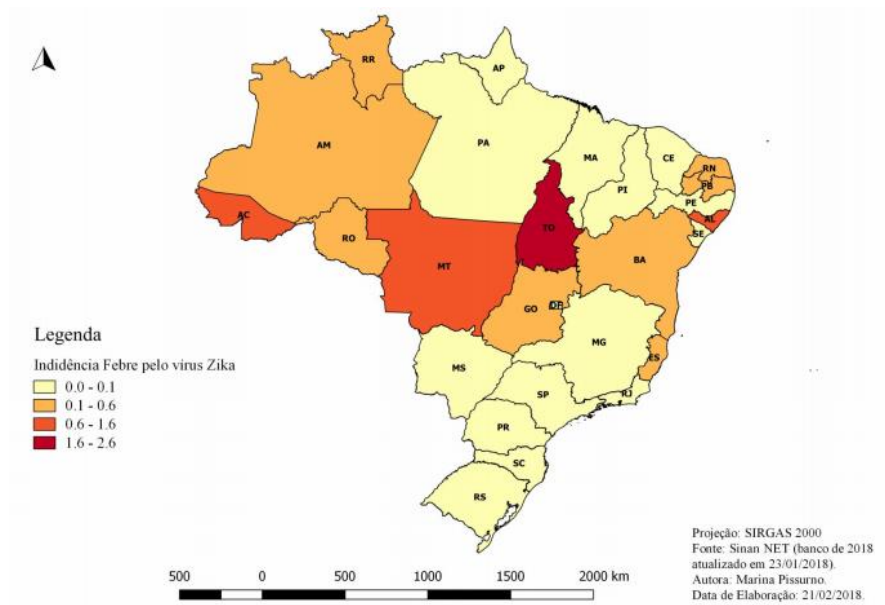
No Brasil, os primeiros casos de transmissão autóctone do ZIKV, foram confirmados em 2015, no Nordeste do país, nos estados da Bahia e Rio Grande do Norte. Até dezembro de 2016, até a semana epidemiológica 52 (SE 52) foram registrados 215.319 casos suspeitos de febre por ZIKV (taxa de incidência de 105,3 casos/100 mil habitantes) distribuídos em 12.973 casos registrados na região Norte, 76.016 na região Nordeste, 91.053 na região Sudeste, 34.284 na região Centro oeste e 993 na região Sul. Desses, 60,7% dos casos foram confirmados (SVS, 2017b).

Em 2017 (Figura 5A), até SE 51, foram registrados 17.452 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, sendo que destes, 8.839 (50,6%) foram confirmados (MS, 2018a). Já em 2018 (Figura 5B), foram registrados 8.680 casos prováveis de doença, com taxa de incidência de 3,2 casos/100 mil habitantes até a semana 52; destes 3.984 (41,7%) foram confirmados (MS, 2018b). A região que apresentou o maior número de casos prováveis (2.584 casos; 38,7%) foi a Sudeste, seguida pelas regiões Nordeste (1.871 casos; 28,0%), Centro-Oeste (1.406 casos; 21,0%), Norte (790 casos; 11,8%) e Sul (34 casos; 0,5%). Entre as Unidades Federativas (UFs), as maiores taxas de incidência foram reportadas em Mato Grosso (16,1 casos/100 mil hab.), Rio de Janeiro (11,7 casos/100 mil hab.), e Goiás (11,6 casos/100 mil hab.). Foram confirmados por análise laboratorial dois óbitos por vírus Zika, no estado de Rondônia e São Paulo no ano de 2017. Em 2018, até a SE 32, foram confirmados dois óbitos por vírus Zika nos estados de Alagoas e Paraíba (MS, 2018a; MS, 2018b).

A)



B)



**Figura 5: Incidência de casos prováveis pelo vírus Zika no Brasil em 2017 e 2018.**  
(A) Incidência de Febre pelo Vírus Zika (/100 mil hab.) por Unidade da Federação, até a Semana Epidemiológica 52, 2017. (B) Incidência de Febre pelo Vírus Zika (/100 mil hab.) por Unidade da Federação, até a Semana Epidemiológica 5, 2018. Fonte: DIAS *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2018.

O número de notificações de crianças recém-nascidas com alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionados à infecção por Zika vírus no Brasil, em 2017, foram de 2.160 casos prováveis, destes 949 confirmados (MS, 2018a). A maioria dos casos foi registrada na região Nordeste do país (65,7%), sendo que os cinco estados com maior número de casos foram Pernambuco (21,3%), Bahia (14,3%), Paraíba (9,0%), São Paulo (8,1%) e Rio de Janeiro (7,8%) (SVS, 2017a). Até a SE 32 de 2018, foram registrados 973 casos prováveis, sendo 355 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial (MS, 2018b).

Mundialmente, o Brasil apresentou o maior número de casos de microcefalia e más formações fetais associados à infecção pelo ZIKV, seguido da Colômbia, Estados Unidos, Guatemala, Martinica, República Dominicana e Guiana Francesa. Também houve elevação no número de casos de SGB em quatorze países, incluindo o Brasil (WHO, 2016a).

A investigação do número de casos do total de indivíduos infectados por ZIKV é dificultada pelos altos índices de casos assintomáticos, estimados em cerca de 80%. Apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória, a maioria dos infectados não manifestarão sinais ou sintomas da doença, o que dificulta ainda mais o conhecimento da amplitude dessa doença e leva a dados controversos entre casos suspeitos e confirmados (DUFFY *et al.*, 2009; CDC, 2016; WHO, 2016a). Ademais, os testes sorológicos (IgM e IgG) disponíveis não são específicos para a detecção do ZIKV, restringindo a identificação do vírus por isolamento ou PCR (Reação de cadeia de polimerase) na fase aguda da doença. Com isso, o número de casos de infecções pelo vírus Zika é estimado a partir de critérios clínico-epidemiológicos ou a partir dos casos descartados para dengue e projeção com base na literatura internacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b).

#### **1.4 Ciclo de Multiplicação Viral**

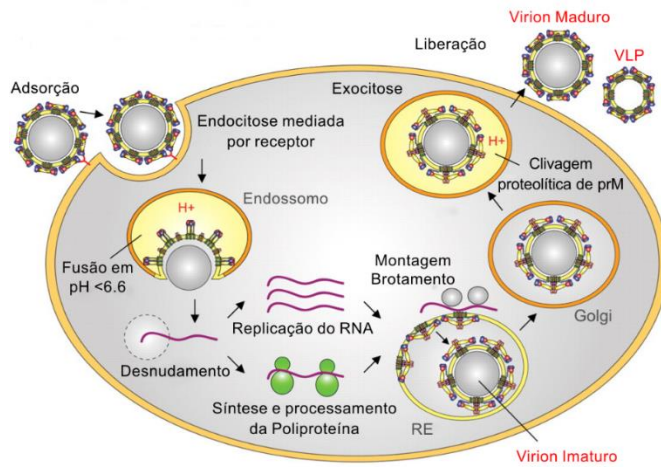
O ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*, bem como para o ZIKV (Figura 6), se inicia pela infecção de células do hospedeiro permissivas aos vírus. As partículas virais se ligam à

células através de interações entre a glicoproteína de superfície E do vírus e receptores celulares e penetram na célula hospedeira por um processo de endocitose mediada por receptor (GOLLINS & PORTERFIELD *et al.*, 1988; ISHAK *et al.*, 1988; NG & LAU, 1988; HAMEL *et al.*, 2015).

Após ser internalizado na vesícula endossomal, a proteína E do vírus sofre modificações conformacionais, gerada pela variação do pH no interior da vesícula, expondo seu peptídeo de fusão que se funde a membrana lipídica do endossomo promove a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular (GOLLINS & PORTERFIELD *et al.*, 1988; HEINZ & STIASNY, 2006; CLYDE *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008) seguido da liberação e tradução do genoma de RNA polaridade positiva para produção de fitas positivas de cópias do genoma e das proteínas envolvidas na replicação viral, que ocorre na superfície do retículo endoplasmático, como a NS5 – que tem função de RNA polimerase RNA-dependente (CLYDE *et al.*, 2006).

As três proteínas estruturais – E, prM e C; e 7 proteínas não-estruturais – NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 serão sintetizadas a partir das fitas de RNA polaridade positiva traduzidas nos ribossomos, dando origem à poliproteína que será clivada e sofrerá processamento pós-traducional por proteases virais e celulares (RICE, 1996; LINDENBACH *et al.*, 2003).

O vírus é montado no interior do retículo endoplasmático como uma partícula imatura constituída por heterodímeros de proteínas E: prM (ZHANG *et al.*, 2003; LINDENBACH; *et al.*, 2013) e é transportado para o aparelho de Golgi onde ocorre a maturação do vírus, no pH ácido da rede trans-Golgi, através de alterações conformacionais das glicoproteínas de superfície e clivagem por uma protease da célula hospedeira, a Furina. Nas partículas virais imaturas, a proteína prM é clivada, dando origem às formas maduras do vírus, ou seja, as formas passíveis de fusão e liberação por exocitose. Com a remoção do peptídeo “pr” durante a maturação, a proteína E fica exposta possibilitando o ciclo de fusão endossomal e secreção pela célula hospedeira. O vírus maduro é então constituído por heterodímeros diméricos de proteínas E: M (KUHN *et al.*, 2002; LINDENBACH *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2013; CORTESE *et al.*, 2017).



**Figura 6: Ciclo de multiplicação dos Flavivirus.**

O vírus entra na célula por endocitose, através da ligação da proteína E do envelope viral a receptores presentes na superfície celular do hospedeiro, o que medeia a internalização na célula. Dentro do endossomo as proteínas virais sofrem mudanças conformacionais proporcionadas pelo baixo pH do meio endossomal, promovendo a fusão entre o envelope e a membrana do endossomo. O RNA é liberado no citoplasma com o desnudamento do capsídeo viral e inicialmente traduzido em uma poliproteína que é processada dando origem às proteínas estruturais e não estruturais (para produzir as proteínas de replicação) do vírus. A replicação ocorre na superfície do retículo endoplasmático. Depois da síntese das proteínas estruturais, os vírions são montados sofrendo brotamentos intracelulares. As partículas imaturas seguem nas vias secretórias (aparelho de Golgi), sofrem maturação (clivagem da proteína prM) e são liberadas da célula por exocitose. RE: Retículo endoplasmático. VLP: Virus-like Particles. Fonte: HEINZ & STIASNY, 2006.

Durante a multiplicação dos flavivírus em estruturas derivadas do retículo endoplasmático, há a remodelação da membrana, com alterações na composição proteica e de lipídios das membranas do RE; e grande sobrecarga na concentração de proteínas virais a serem processadas nesta organela (WELSCH *et al.*, 2009; GILLESPIE *et al.*, 2010; PERERA *et al.*, 2012; JUNJHON *et al.*, 2014). Este acúmulo induz o estresse do retículo endoplasmático que resulta na ativação de uma resposta de sinalização celular denominada resposta de proteína desdobrada (UPR), que pode ser modulada pelos vírus para seu próprio benefício. Concomitantemente com a ativação da UPR ocorre a ativação de autofagia em células infectadas, fato visualizado em modelos experimentais com diferentes flavivírus (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014). A relação entre estresse do retículo endoplasmático, UPR e autofagia em células infectadas pode ser a chave para elucidar a replicação e a patogênese desses vírus. A abordagem sobre UPR e infecções virais será feita no item 2.

## 1.5 Manifestações clínicas

A Zika é uma doença exantemática com apresentação clínica semelhante à de outras infecções por arbovírus, como chikungunya e dengue.

Após o contágio com o ZIKV, o período de incubação em humanos pode variar entre três e 12 dias, sendo que grande parte das infecções pode permanecer assintomática (DUFFY *et al.*, 2009; MUSSO *et al.*, 2014b; BROOKS *et al.*, 2016). A evolução para quadros sintomáticos pode apresentar uma variedade de sintomas, que nem sempre estão presentes conjuntamente.

A infecção por ZIKV, quando sintomática, é normalmente caracterizada pelo aparecimento de exantema maculopapular; febre aguda (37,8 °C - 38,5 °C) autolimitada, com duração de dois a sete dias; artralgia; mialgia, dor de cabeça conjuntivite e/ou uveíte. Alguns sintomas como tosse, vômito, dor de garganta e dor retro orbitária, também já foram relatados (ARMSTRONG *et al.*, 2016; ECDC, 2016; ESTOFOLETE *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2016). Ao contrário de outras arboviroses, como a Dengue, não foram notificados sinais hemorrágicos em doentes infectados com ZIKV (DUFFY *et al.*, 2009; KWONG *et al.*, 2013). No entanto, complicações neurológicas, como microcefalia associada ao vírus em recém-nascidos e neuropatias periféricas foram descritas (OEHLER *et al.*, 2014; CALVET *et al.*, 2016; KLASE *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; MS, 2016; WHO, 2016). Os primeiros estudos sobre os casos de microcefalia fetal e sua associação à transmissão vertical do vírus e o aumento do número de casos de neuropatias periféricas, como a SGB, concomitante ao aumento do número de notificações de ZIKV sugeriram uma relação causal (DE PAULA *et al.*, 2016; MARTINES *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; VENTURA *et al.*, 2016). Ressalta-se que a ocorrência de microcefalia associada à infecção pelo ZIKV aumentou a vigilância a este tipo de má-formação, evidenciando que este tipo de evento era essencialmente subnotificado no Brasil antes da circulação do vírus.

## 1.6 Microcefalia e ZIKV

A microcefalia é caracterizada pela redução do perímetro cefálico devido à destruição de células neuronais que levam ao desenvolvimento inadequado do cérebro (SILVA & SOUZA, 2016). A alteração pode ser detectada por ultrassom, tomografia, ou por medições perimétricas cefálicas. As características comuns na microcefalia congênita incluem a desproporcionalidade facial em comparação com a cabeça e "*cutis girata*" (dobras do couro cabeludo, causadas pelo crescimento contínuo da pele à medida que o desenvolvimento cerebral diminui). Além disso, os recém-nascidos podem apresentar hiperreflexia, irritabilidade, tremores e convulsões, anormalidades auditivas e visuais. Neuroimagens frequentemente revelam calcificações, entre outras alterações, como hipoplasia do tronco cerebral e do cerebelo e ventriculomegalia (MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; WHO, 2016e). A síndrome fetal de ZIKV assemelha-se às outras infecções de contágio transplacentário, associadas às malformações congênitas, como toxoplasmose, sífilis e rubéola, e devido a este conjunto de sinais e sintomas é denominada Síndrome Congênita do Vírus Zika (SCVZ) (KLASE *et al.*, 2016; MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da patologia encefálica e a infecção de células neurais dependem da habilidade do vírus para entrar no SNC e na célula, ou seja, da neuroinvasão e da neurovirulência (MCMINN, 1997). O tropismo para neurônios motores já foi descrito para vários flavivírus, como JEV, WNV, TBEV e DENV (SOLOMON, 2004; SIPS *et al.*, 2012). Estudos detectaram a presença tanto do RNA de dengue vírus quanto de anticorpos específicos anti-dengue em amostras de líquido cefalorraquidiano comprovando a possibilidade de neuroinvasão destes vírus (DOMINGUES *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008). Inicialmente a relação causal entre vírus e doença foi atribuída a, provavelmente, ser consequência de mutações virais recentes, baseada na hipótese de que a ocorrência de mutações propicia a geração de amostras virais mais virulentas. Para outros membros da família *Flaviviridae* está bem estabelecido que mutações no gene que codifica a glicoproteína E do envelope viral aumentam a sua virulência e a sua capacidade de danificar o sistema nervoso central (SIPS *et al.*, 2012). No sistema nervoso central podem ser visualizadas reação intracitoplasmática granular e ativação

de micróglia e macrófagos, o que sugere a localização do vírus nos neurônios e a interferência da resposta imune do hospedeiro na patogênese da microcefalia (MLAKAR et al., 2016).

A epidemia de ZIKV nas Américas e a associação observada em anormalidades fetais (microcefalia) e patologia autoimune adulta (síndrome de Guillain-Barré) chamaram a atenção para esse patógeno (OLIVEIRA, et al., 2016; MS, 2016a; WHO, 2016c). O alto número de casos no Brasil, principalmente na região nordeste, provocou uma rápida mobilização de especialistas em saúde pública. Alguns estudos mostraram uma correlação entre a infecção por ZIKV e a taxa excepcionalmente alta de microcefalia infantil observada durante o surto - o Brasil relatou uma alarmante cifra de 7.438 casos suspeitos de microcefalia pela 18ª semana epidemiológica de 2016; no entanto, apenas 1.326 destes casos foram confirmados como infecção congênita. Embora um número significativo de casos tivesse sido excluído desta associação, a relação epidemiológica e resultados de pesquisas experimentais apoiam que há uma relação causal entre Infecção intrauterina de ZIKV e microcefalia primária fetal (CALVET et al., 2016; CUGOLA et al., 2016; KLASE et al., 2016; MIRANDA-FILHO et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; SARNO et al., 2016, WHO, 2016e).

Vários estudos demonstraram a presença do vírus Zika no sistema nervoso central, em órgãos como rins e fígado em autópsias de recém-nascidos (WILEY & CHIMELLI, 2017), bem como no líquido amniótico de mulheres grávidas infectadas (CALVET et al., 2016) e em modelos experimentais (CUGOLA *et al.*, 2016). Experimentos *in vivo* em embriões de camundongos demonstraram a transmissão vertical do ZIKV e confirmaram seu direcionamento seletivo para os progenitores neurais (GLADWYN-NG *et al.*, 2018).

O mecanismo molecular da microcefalia induzida pelo vírus Zika foi proposto se iniciando na transmissão transplacentária durante o primeiro trimestre da gravidez e propagação do vírus em células progenitoras neurais humanas (hNPCs), onde a entrada é facilitada pelo receptor (proteína AXL) levando à sinalização e ativação imunológica nas células hospedeiras. A regulação negativa da neurogênese e a regulação positiva da apoptose em hNPCs levam à parada do ciclo celular e à morte dos neurônios em desenvolvimento ocasionando os distúrbios neurológicos, como a microcefalia (FAIZAN *et al.*, 2016). A doença neurológica causada pelo ZIKV parece ocorrer por meio de dois

mecanismos diferentes dependentes do período gestacional. Quando a infecção ocorre no primeiro trimestre de gravidez, o vírus infecta células progenitoras neurais causando graves alterações do desenvolvimento, já infecções mais tardias foram associadas à infecção meníngea e lesões isquêmicas destrutivas do cérebro (WILEY & CHIMELLI, 2017).

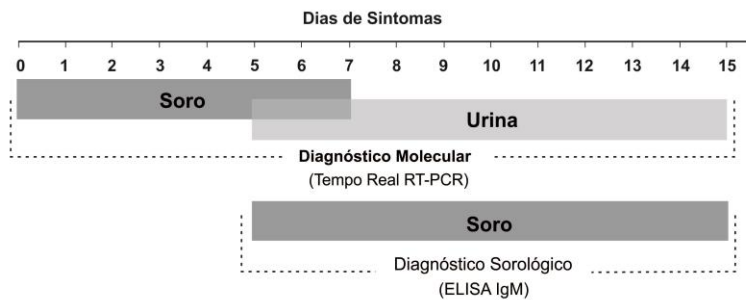
Estudos recentes demonstraram diferenças intrínsecas na resposta inflamatória induzida por diferentes amostras de ZIKV determinantes para a gravidade da doença (TRIPATHI *et al.*, 2017). Há maior associação de casos de microcefalia em infecções com amostras de ZIKV de origem asiática. Na literatura, vários trabalhos comparam as características de infecção de amostras de ZIKV das duas origens virais, asiática e africana, e os dados indicam que existem diferenças intrínsecas na patogenicidade e na virulência. Os estudos têm corroborado dados que mostram menor taxa de infecção, menor produção de vírus e baixa indução de morte celular precoce para amostras de origem asiática em relação às amostras africanas, que desencadearam mais morte celular e diferenças nas taxas de replicação viral. Especula-se que o fenótipo apresentado pelas amostras asiáticas de ZIKV contribua, pelo menos em parte, para a capacidade de causar infecções persistentes no SNC de fetos, enquanto amostras de origem africana podem resultar em uma infecção mais aguda e levaria à uma interrupção precoce da gravidez, ao passo que a infecção causada pelo vírus de origem asiática seria menos destrutiva e mais crônica, permitindo assim que a gravidez continuar, levando ao desenvolvimento de malformações congênitas (ANFASA *et al.*, 2017; SIMONIN *et al.*, 2017).

Estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos do ZIKV em animais e amostras de cortex cerebral de humanos revelaram além de um forte tropismo do ZIKV por precursores neuronais do córtex cerebral, que a infecção neste local prejudica a progressão do ciclo celular e desencadeia morte celular por ativação de apoptose e autofagia que levam à microcefalia (CUGOLA *et al.*, 2016; GARCEZ *et al.*, 2016; GLADWYN-NG *et al.*, 2018) e que há associação destes mecanismos com a ativação de vias de reposta associadas ao retículo endoplasmático, local onde são processadas as proteínas virais. A ativação destas vias resultou no bloqueio de neurogênese e na morte apoptótica neuronal, o que levou à microcefalia cortical. A ativação de vias de

resposta do retículo endoplasmático na infecção pelo ZIKV desempenha um papel crucial em muitos processos celulares distintos e a sua indução pelo ZIKV pode ser responsável por vários sintomas neurológicos associados a este vírus (GLADWYN-NG *et al.*, 2018; ALFANO *et al.*, 2019).

### 1.7 Diagnóstico do ZIKV

O diagnóstico pode ser feito a partir amostras biológicas variadas como urina, sangue/soro, liquor, sêmen, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, placenta, fragmentos de tecido (BARZON *et al.*, 2013; WHO, 2014; MUSSO *et al.*, 2015a; MUSSO *et al.*, 2015b; PATIÑO-BARBOSA *et al.*, 2015; GOURINAT *et al.*, 2015; ATKINSON *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016; JURADO *et al.*, 2016; OLSON *et al.*, 2016). As metodologias empregadas no diagnóstico laboratorial da infecção por ZIKV têm baseado principalmente em ferramentas moleculares, por meio da detecção do material genético do vírus, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), além de testes sorológicos, pela detecção de anticorpos dos tipos IgG e IgM, que devem ser interpretados com cautela devido à possibilidade de resposta cruzada com outros *flavivirus* (DUFFY *et al.*, 2009; BINGHAM *et al.*, 2016; HUZLY *et al.*, 2016; STETTLER *et al.*, 2016; VAN ESBROECK *et al.*, 2016). O método de escolha deve respeitar o período da infecção que será determinante para o sucesso do teste. Métodos moleculares, baseados na detecção do RNA viral, devem ser realizados, preferencialmente, em amostras de até sete dias após o início dos sintomas, enquanto métodos sorológicos, para a detecção de anticorpos, devem ser realizados após quatro dias (IgM) ou após 15 dias (IgG) de início dos sintomas (Figura 7) (PAHO, 2016).



**Figura 7: Indicação para o diagnóstico de ZIKV segundo dia de início dos sintomas e tipo de amostra.**

O RNA viral pode ser detectado até o sétimo dia após o aparecimento dos sinais e sintomas por técnicas moleculares. Em alternativa, o RNA viral pode ser detectado na urina em até 15 dias após o início dos sintomas. A sorologia para detecção dos anticorpos deve ser realizada após quatro dias de início de sintomas. A imunoglobulina M (IgM) pode ser detectada mais precocemente, enquanto a imunoglobulina (IgG) deverá ser detectada num período superior a quinze dias de início dos sintomas. Fonte: PAHO, 2016.

Os métodos moleculares possuem sensibilidade e especificidade elevadas, dependendo do estágio da doença. Apesar de altamente confiáveis, possuem custo elevado, exigem infraestrutura e equipamentos sofisticados e equipe técnica capacitada. No sangue, a detecção deve ser feita em até 7 dias após o início dos sintomas, contudo, elevada carga viral em amostras de urina tem sido detectada em período mais prolongado da fase aguda (BARZON *et al.*, 2013; GOURINAT *et al.*, 2015; DRIGGERS *et al.*, 2016; PAHO, 2016). A detecção específica do ZIKV pela técnica de RT-PCR é feita com iniciadores e sondas específicos para genes que codificam para as proteínas E, a junção membrana-envelope (M/E), envelope parcial (pE) e a NS5 de ZIKV (FAYE *et al.*, 2008; FAYE *et al.*, 2013; BALM *et al.*, 2012). Além dos testes de identificação do RNA ou de anticorpos, antígenos virais podem ser pesquisados em ensaios imunohistoquímicos com anticorpos monoclonais ou pela técnica de PCR em autópsia de tecidos. (BUCKLEY & GOULD, 1988; HAMEL *et al.*, 2015). Ademais, o vírus pode ser isolado em técnicas de cultivo celular a partir de sangue humano, sêmen e urina (CAO-LORMEAU, 2014; FONSECA *et al.*, 2104; MUSSO *et al.*, 2105).

A sorologia de ZIKV é geralmente realizada por ELISA seguida pela confirmação por ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT) (JOHNSON *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2000; KUNO, 2003; WHO, 2007; MAEDA & MAEDA, 2013). O PRNT é considerado o teste "padrão-ouro" para a detecção específica de anticorpos anti-*Flavivirus*, possuindo alta especificidade em infecções primárias (KUNO, 2003; LANCIOTTI *et al.*,

2008 364). Contudo, é um teste dispendioso e deve ser realizado em laboratórios altamente especializados e regulamentados, devido à manipulação de vírus vivos (MUSSO & GUBLER, 2016).

Alguns testes imunocromatográficos estão disponíveis no mercado, no entanto, apesar de vantajosos em relação aos outros disponíveis pela praticidade, custo e rapidez no resultado, apresentam as mesmas desvantagens de resposta cruzada frente a outros *flavivírus* mostradas pelos testes sorológicos citados (LANCIOTTI *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). A presença de reatividade cruzada com IgM de outros flavivírus, principalmente em infecções secundárias, tanto com IgM ELISA, quanto pelo PRNT (LANCIOTTI *et al.*, 2008), dificulta a utilização destes métodos. Alguns estudos mostraram o aumento de anticorpos heterólogos para outros flavivírus, em infecções secundárias por vírus do mesmo grupo (THEILIER & CASALS, 1958; BEARCROFT, 1956).

O protocolo preconizado pela OMS, em caso de suspeita de ZIKV, deve ser feito em amostras de soro ou saliva de fase aguda, pela técnica de RT-PCR específico de ZIKV, ou pan-flavivírus com sequenciamento de produto de PCR em amostras positivas. Após a fase aguda a urina ainda pode ser utilizada para o diagnóstico. Se a avaliação pelos métodos moleculares for negativa, a sorologia pode ser considerada, no entanto, os resultados devem ser avaliados com cautela devido à possibilidade de reatividade cruzada. Neste caso, as coletas de amostras de soro devem ser feitas de forma pareada, em um intervalo de 4 semanas, e um resultado positivo de ZIKV IgM deve ser confirmado pelo método de PRNT (PAHO, 2016).

O diagnóstico de ZIKV associado às complicações neurológicas, como a SGB, é feito da mesma forma descrita previamente. Como, normalmente a suspeita de uma síndrome neurológica ocorre fora do período de viremia é recomendado que a detecção molecular seja realizada em amostras de urina, ou através da detecção de anticorpos IgM na amostra de soro por ELISA. Amostras de fluido cerebrospinal (CSF) devem ser consideradas (PAHO, 2016).

Outros exames laboratoriais, menos específicos, têm demonstrado alterações sanguíneas, como leucopenia, presença de linfócitos ativos, trombocitopenia, aumento dos níveis de transaminases (DUPONT-ROUZEYROL *et al.*, 2015; GOURINAT *et al.*, 2015), albuminemia e presença de pigmento biliar na urina (MACNAMARA *et al.*,

1954), que são alterações presentes em várias outras infecções virais. Não obstante, a realização do hemograma completo em todos os casos suspeitos de Zika é recomendada (MUSSO & GUBLER, 2016).

A identificação precoce dos casos de Zika, com rápida detecção dos casos e diagnóstico diferencial, é de fundamental importância para o imediato início dos cuidados clínicos, acompanhamento da evolução clínica dos pacientes e condução do tratamento adequado. Do ponto de vista epidemiológico, investir na implantação de medidas preventivas e de contenção, visando evitar a ocorrência de complicações e óbitos. Devido ao aumento expressivo do número de casos de ZIKV em diferentes regiões do mundo, avanços na área da medicina laboratorial são necessários. No contexto atual, cabe aos profissionais atuantes na área da saúde conheçam os prós e os contras de cada teste disponível no diagnóstico laboratorial da infecção por ZIKV, bem como sua interpretação; os espécimes biológicos que podem ser utilizados e a fase clínica para a detecção, seja da partícula viral ou de anticorpos gerados durante a infecção.

### **1.8 Resposta Imune Inata e o Zika virus**

A interface entre mamíferos e mosquitos no local da infecção é importante nas infecções por arbovírus, sendo aspecto limitante na disseminação do vírus pelo organismo e no desenvolvimento da doença clínica. A entrada do ZIKV no organismo ocorre, principalmente, por transmissão vetorial, durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito do gênero *Aedes* (BOORMAN & PORTERFIELD, 1956; MARCHETTE *et al.*, 1969; MCCRAE & KIRYA 1982; DIAGNE *et al.*, 2015). O vírus é injetado junto a saliva do mosquito na pele humana e infecta células permissivas, como fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas imaturas (HAMEL *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm avaliado o papel da saliva do mosquito na potenciação da infecção. *Pingen e colaboradores* (2016), demonstraram a ativação da resposta inflamatória e recrutamento de leucócitos, com o favorecimento da disseminação da infecção. Ademais, foi visto que a ocorrência de edema provocada pela picada do mosquito

contribuiu para a retenção dos vírus no local da picada e facilitou a infecção destas células.

Após a inoculação do vírus pelo mosquito, a penetração do ZIKV na célula se inicia pela interação com receptores e/ou moléculas de adesão presente na superfície celular, como receptores DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin*), receptores transmembranares que se ligam a fosfatidilserina TIM (receptor de célula T imunoglobulina e domínio mucina) e TAM (receptor da tirosina-quinase). Receptores TAM como, por exemplo, AXL e Tyro3 estão presentes em fibroblastos cutâneos, queratinócitos epidérmicos, macrófagos, células de endotélio vascular e astrócitos; e propiciam a entrada do vírus, através da interação com a proteína do envelope viral (TASSANEETRITHEP, 2003; LOZACH, 2005; LEMKE & ROTHLIN, 2008; HAMEL *et al.*, 2015).

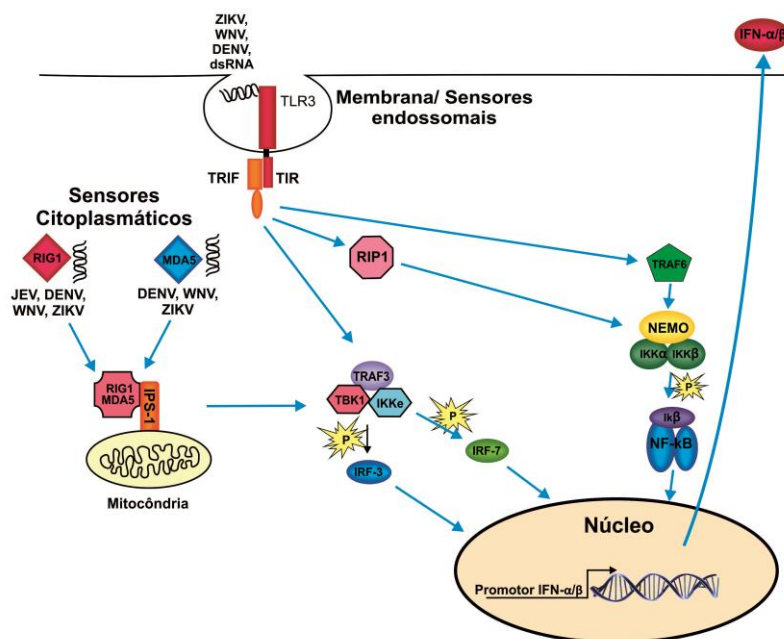
O aumento da expressão de Tyro3 mostrou estar relacionado ao aumento da permissividade de células ao vírus em experimento *in vitro* com ZIKV. Em contraste, receptores TIM tiveram efeitos não muito expressivos na entrada de ZIKV nas células, quando avaliado separadamente, ao passo que em conjunto com AXL mostrou-se importante para o favorecimento da infecção. Esta variedade de receptores que medeiam a entrada do vírus na célula pode garantir uma vantagem evolutiva para o vírus, uma vez que implica na capacidade de infectar uma vasta gama de células e expandir a infecção. No entanto, a contribuição de cada um destes receptores e/ou fatores de ligação, ou mesmo de outras moléculas de superfície, para o alastramento da infecção do ZIKV não é totalmente conhecida (BRIANT *et al.*, 2014; PERERA-LECOIN *et al.*, 2014; HAMEL *et al.*, 2015).

A interação da proteína viral E de flavivírus com moléculas da superfície celular e a entrada do vírus na célula é seguida pela indução de uma resposta inata antiviral, disparada pela ativação de receptores de reconhecimento de padrões específicos (PRRs) capazes de detectar a presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em resposta à infecção (PERERA-LECOIN *et al.*, 2014). Logo após a entrada e liberação do genoma viral, o RNA do vírus induz a transcrição de genes estimulados por Interferons (ISG) tais como OAS2, MX1 e ISG15, bem como a transcrição dos receptores RIG-1, MDA-5 e TLR-3. Estudo prévio utilizando fibroblastos infectados com ZIKV

mostrou um aumento na expressão de PRRs do tipo *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-1), *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) e receptor tipo toll 3 (TLR3). A inibição da expressão de TLR3 resultou no aumento no número de cópias do RNA viral, destacando a importância do TLR3 na indução de uma resposta antiviral contra ZIKV. No mesmo ensaio de infecção de fibroblastos por ZIKV, também foi demonstrada a ativação de componentes de inflamação, evidenciada pelo aumento na expressão de AIM2 (*Interferon-inducible protein*) e interleucina-1 (IL-1) (HAMEL *et al.*, 2015).

A detecção de PAMPs virais por esses PRRs desencadeia vias de sinalização que resultam no aumento dos fatores de transcrição da resposta antiviral. Alguns deles, também visto em infecções por outros flavivírus, como o IRF7 (fator regulador de transcrição do interferon), têm seus níveis de mRNA aumentados, em células infectadas com ZIKV, e desencadeiam a expressão de interferon do tipo I (IFN-1). A via de ativação de NF-κB (fator nuclear kappa B) também é ativada, contribuindo para o aumento da produção dessa citocina (ONOGUCHI *et al.*, 2011; ABBAS, 2015). Os IFNs no controle de infecções por flavivírus, inclusive ZIKV, como demonstrado pela diminuição na liberação de partículas virais em experimentos *in vitro*, inibem a replicação viral (HONDA *et al.*, 2005; SHRESTHA *et al.*, 2006; PRESTWOOD *et al.*, 2012; HAMEL *et al.*, 2015; MUSSO & GLUBER, 2016).

Em suma, a ativação dos receptores RIG-1, MDA-5 e TLR-3 e, conseqüentemente, da resposta inflamatória, busca controlar a infecção, principalmente pelo aumento da produção de IFN-1. Duas vias estão associadas a este controle: a ligação à TLR-3 que ativa fatores de transcrição aumentando a produção de IFN-1 (HAMEL *et al.*, 2015; ABBAS, 2015) e o reconhecimento do RNA viral e ativação de RLRs (RIG-like receptors), como RIG-1 e MDA-5 (HAMEL *et al.*, 2015) que leva a ativação de fatores de regulação de interferon 3 e 7 (IRF-3 e IRF-7) e NF-κB e resulta no aumento da produção de IFN-1, culminando com a redução da liberação de partículas virais (ONOGUCHI *et al.*, 2011; ABBAS, 2015; HAMEL *et al.*, 2015). Um esquema do funcionamento das vias de resposta de TLR3, RIG-1 e MDA-5 na infecção por flavivírus pode ser visualizado na Figura 8.



**Figura 8: Vias de Resposta de TLR3, RIG-1 e MDA-5 na infecção por flavivírus.**

PRRs envolvidos na detecção de flavivírus, como o TLR3, RIG-1 e MDA-5, detectam o RNA de viral e ativam vias de sinalização que culminam na regulação positiva de fatores de transcrição de genes de interferon, como por exemplo, IRF-3 e IRF7. A ativação de RIG-1 e MDA-5 leva à interação destes dois PRRs e posterior ativação de IPS-1, uma proteína mitocondrial de sinalização antiviral, que ativa proteínas quinases TBK1 e IKK e indutores de interferon através da fosforilação de fatores de transcrição IRF3 e IRF7. Para a via TLR3, a molécula intermediária antes da convergência das vias é a proteína citoplasmática TRIF, que também ativa as proteínas quinases TBK1 e IKK indutores de interferon através da fosforilação de fatores de transcrição IRF3 e IRF7, mas também atua na ativação do modulador essencial de NF-kappa-B (NEMO), via Fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) e proteína de interação ao receptor cinase (RIP-1), o que aumenta a produção de interferons do tipo 1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Fonte: Adaptado de MUÑOZ-JORDÁN JL & FREDERICKSEN, 2010.

No curso da infecção por *ZIKV*, na fase aguda, há a ativação de células T e o aumento da expressão de algumas citocinas, entre elas, da quimiocina CCL5 (*Rantes*) que está associada à migração de macrófagos, células NK (*Natural killers*) e interação entre células T e células dendríticas. Também há o aumento da expressão do receptor de quimiocina CXCR3, bem como de seu ligante, a quimiocina CXCL10, que também contribuem para o aumento da ativação de células inflamatórias, células NK e linfócitos T CD8. (HAMEL *et al.*, 2015). Desta forma, há a polarização da resposta imune em padrões do tipo Th1, marcada inicialmente pela produção de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6. Respostas do tipo Th2 (IL-4, IL-13 e IL-10); Th9 (IL-9) e Th17 (IL-17) ocorrem durante a fase resolutive, com expressão adicional de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13 (MURPHY *et*

*al.*, 2000; HOFMANN *et al.*, 2002; JONES, 2005; HOYER *et al.*, 2008; BEDOYA *et al.*, 2013; KAPLAN, 2013; HAMEL *et al.*, 2015; ABBAS, 2015; MUSSO & GLAUBER, 2016; TAPPE *et al.*, 2016).

Os vírus utilizam diversos mecanismos celulares na tentativa de evadir a resposta imune e manter a sua replicação. Contudo, os mecanismos pelos quais os vírus garantem a sua sobrevivência frente a resposta imune do organismo, principalmente por facilitar a replicação viral, bem como a patogênese da infecção por *ZIKV* ainda não estão completamente elucidados (HAMEL *et al.*, 2015; MUSSO & GLUBER, 2016).

Muitas vias de sinalização celular deflagradas pela infecção já foram delineadas para diversos arbovírus. Entre elas, a ativação de vias de sinalização a proteínas não dobradas (UPR) que ocorrem no retículo endoplasmático em resposta à infecção viral.

A modulação desta via demonstra ser útil no aumento da replicação viral, através do aumento da expressão de chaperonas e da regulação do metabolismo. Para manter máxima replicação viral, os vírus desenvolveram mecanismos diferentes para ativar seletivamente parte da UPR e aliviar o estresse do RE (HOOPER *et al.*, 2012). Contudo, para o *ZIKV*, esta via de sinalização e a sua implicação na resposta à infecção ainda não está completamente elucidada.

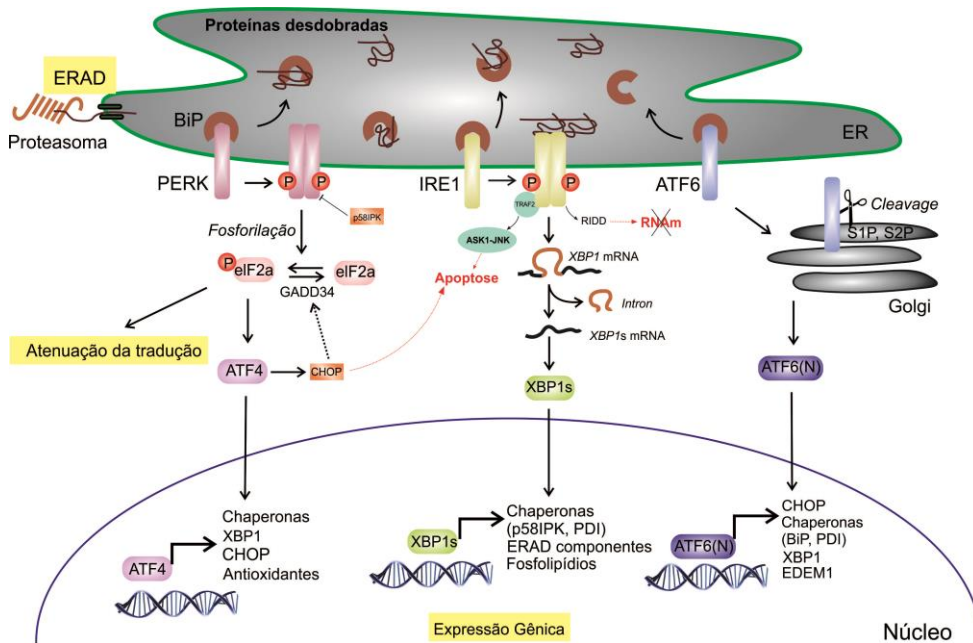
## 2. Via de sinalização a proteínas não dobradas (UPR)

A UPR é uma via complexa de sinalização que é ativada em resposta a variações que interferem no dobramento de proteínas no Retículo Endoplasmático (RE). Neste processo há a regulação da transcrição, acoplado à sinalização intracelular do RE para o núcleo e é chamado de resposta à proteínas não dobradas, ou mal dobradas, ou mal formadas (UPR, do inglês: *Unfolded Protein Response*) (MCMILLAN *et al.*, 1994; SHAMU *et al.*; 1994).

É no retículo endoplasmático (ER), uma organela intracelular, que ocorre além de funções como a manutenção do cálcio intracelular e a síntese de lipídeos e esteróis, a síntese e a formação correta da estrutura de proteínas, como modificações pós traducionais e formação de complexos proteicos. As cadeias polipeptídicas recentemente sintetizadas são translocadas para o lúmen do RE, onde passam por processos de maturação tais como clivagem, glicosilação, formação de ligações dissulfeto, dobragem e montagem. Somente as proteínas que passam pelo processamento correto são encaminhadas para o aparelho de Golgi para secreção ou exposição na superfície celular. Para assegurar o dobramento adequado, o RE mantém um ambiente controlado de forma a estabelecer o equilíbrio entre carga proteica e capacidade de processamento (KIM *et al.*, 2008; FAGONE & JACKOWSKI, 2009; OSLOWSKI & URANO, 2011; SANO & REED, 2013; BORIUSHKIN *et al.*, 2014).

A perturbação dos processos de maturação da proteína e o aumento desequilibrado da taxa de síntese proteica resultam na acumulação de proteínas não dobradas no lúmen do RE. Esta condição é conhecida como estresse do RE. Para resguardar a função do RE e garantir a dobragem correta das proteínas, as células desenvolveram um mecanismo adaptativo conhecido como: Resposta à proteínas desdobradas ou não dobradas ou mal enoveladas (UPR). O controle desta via é feito por 3 sensores (Figura 9) acoplados à membrana do RE, denominados PERK (PKR-like ER kinase), IRE1 (Inositol-requiring enzyme1) e ATF6 (Activating transcription factor 6). A ativação destes sensores ocorre em situações que levam ao estresse do RE e atuam principalmente na redução da carga de trabalho do ER pela diminuição da atividade ribossômica, através da via mediada pelo PERK; ou pela modulação da transcrição de vários efetores envolvidos em

diferentes eventos celulares pelas vias mediadas por IRE1 $\alpha$  e ATF6 (BERTOLOTTI *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2003; RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004; SHEN *et al.*, 2004; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2005).



**Figura 9: Os três braços da UPR.**

Os três sensores de estresse RE (PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6) presentes na membrana, inicialmente inativados por associação à chaperona BiP, são ativados pela sua dissociação em condições de estresse do RE, como por exemplo, acúmulo de proteínas não dobradas (UPR). Com isto, é disparada uma cascata de sinalização que aumenta a capacidade de dobramento de proteínas e reduzem a carga proteica no RE, através da diminuição da transcrição e da tradução global de proteínas. PERK fosforila eIF2 $\alpha$ , que por sua vez atenua a tradução global e, em paralelo, aumenta a expressão do fator de transcrição ATF4. Este induz a transcrição de genes com funções de restaurar a proteostasia, como chaperonas, XBP1 e CHOP. CHOP, possui função pro-apoptótica e também induz a transcrição de GADD34, criando um mecanismo de *feedback* negativo, com a desfosforilação de eIF2 $\alpha$ . IRE1 sinaliza o recrutamento de TRAF2 conduzindo a ativação da cascata ASK1-JNK e, consequentemente, de apoptose. Em outro braço, IRE1 participa do *splicing* de mRNA de XBP1, que atua regulando a transcrição de vários genes envolvidos na resposta a UPR, como chaperonas e componentes de degradação do sistema ERAD. Além disso, IRE1 também pode atuar ativando a degradação de RNAs (atividade RIDD), regulando assim a expressão gênica e os níveis de transcrição. Finalmente, após o estresse RE, o ATF6 é exportado para o complexo de Golgi onde é clivado pelas proteases S1P e S2P, libertando o seu domínio citosólico que é um potente fator de transcrição. O ATF6 regula a transcrição de vários genes envolvidos na resposta a UPR, como chaperonas, XBP1 e componentes de degradação (EDEM1). Juntos, os fatores de transcrição da UPR determinam o destino das células através da regulação de diferentes subconjuntos de genes alvo para a recuperação da homeostase ou a indução de apoptose. Fonte: Adaptado de KADOWAKI & NISHITOH, 2013.

Alguns estímulos fisiológicos e patológicos, que levam à alta demanda de proteínas, como em condições de privação de nutrientes, hipóxia, depleção de cálcio, formação prejudicada de glicosilação ou ponte dissulfeto, estresse oxidativo, toxinas ambientais, citocinas inflamatórias, desordens neurodegenerativas, infecções bacterianas ou virais, entre outros, podem perturbar a homeostase e propiciar acúmulo de proteínas não dobradas no lúmen do RE, ou seja, o estresse do RE (LIU *et al.*, 1997; REYES-DEL VALLE *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2010; ZHANG & WANG, 2012; LUO & LEE, 2013). A ativação de vias compensatórias do estresse do RE desempenha papel importante no controle do desenvolvimento de doenças como o câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas e vasculares (YOSHIDA *et al.*, 2007).

O processo de adaptação para manutenção das condições ótimas de funcionamento do RE pode transcorrer por três formas: pela atenuação rápida e transitória da síntese de novas proteínas, como uma tentativa por parte da célula de limitar a carga proteica a ser dobrada pelo RE; pela regulação positiva da expressão de genes que promovem a dobragem de proteínas; ou pela degradação de proteínas com defeito no RE (URANO *et al.*, 2000). Estes mecanismos são controlados pela ativação da rede de sinalização UPR, com o objetivo de aliviar o estresse e restaurar o equilíbrio, promovendo a sobrevivência celular e adaptação. Contudo, em caso de falha dos sinais adaptativos na tentativa de manter a sobrevivência celular, parte da via de sinalização da UPR pode ativar a via de morte celular por apoptose (TARDIF *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2003; CHUNYAN *et al.*, 2005; ZHANG & KAUFMAN, 2006; RON & WALTER, 2007; KIM *et al.*, 2008; MARCINAK & RON, 2010; OSLOWSKI & URANO, 2011).

Neste caso, são induzidos eventos de transdução de sinal, associados à imunidade inata e à defesa do hospedeiro, conhecidos como mecanismos de alarme induzidos por UPR, incluindo quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK), p38 e outras quinases responsáveis pela ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), (KANEKO *et al.*, 2003; CHUNYAN *et al.*, 2005; Xu, 2005; KIM *et al.*, 2008; TABAS E RON, 2011).

Com isso, os mecanismos de controle de qualidade do dobramento de proteínas visam garantir que somente proteínas dobradas corretamente possam atingir o seu destino

final. Aquelas que não atendem às exigências do sistema de controle de qualidade RE são mantidas neste local, onde chaperonas tentam corrigir seu dobramento para alcançar a sua conformação correta. Se mesmo assim, alguma proteína não maturar adequadamente são eliminadas por um sistema de degradação associado ao RE (ERAD) (WERNER *et al.*, 1996; JAROSCH *et al.*, 2003). Com a transcrição dos genes associados ao ERAD, proteínas não dobradas serão transportadas para o citosol, onde serão degradadas pelo complexo de proteassoma (WERNER *et al.*, 1996; HERSHKO *et al.*, 1983; HARDING *et al.*, 1999; HAMPTON, 2000; TABAS E RON, 2011).

O dobramento de proteínas é feito principalmente através da participação de chaperonas (HAMMOND *et al.*, 1995). A ativação desta resposta no sentido de aumentar a capacidade de dobramento de proteínas pela ação de chaperonas, em conjunto a outros mecanismos, visa reduzir o estresse de RE. Essas chaperonas são importantes para garantir as corretas modificações pós- traducionais, montagem e controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas (LEE *et al.*, 2007; SCHARDT *et al.*, 2011; BORIUSHKIN *et al.*, 2014).

Algumas chaperonas envolvidas no processamento correto das proteínas no RE são a calregulina (ou calreticulina), a PDI (Proteína Dissulfeto Isomerase), p58IPK (ou DNAJC3/DNAJ homolog subfamily C member 3) e a BiP (Binding Protein, HSPA5 - heat shock 70 kDa protein 5 ou GRP78 glucose responsive protein). A calreticulina além de atuar como uma chaperona propiciando o enovelamento de proteínas, que tem seus níveis aumentados em condições de acúmulo de proteínas não dobradas, possui função de ligação e armazenamento de cálcio no lúmen do RE e uma vez em condições de estresse prolongado pode ativar vias apoptóticas (LEE *et al.*, 2007; SCHARDT *et al.*, 2011). A PDI é responsável pela formação de ligações dissulfeto em proteínas e está associada à modulação da geração de espécies reativas de oxigênio. Alguns estudos demonstraram a atuação de PDI em resposta a doenças neurodegenerativas e em modelo de isquemia, mostrando indução da expressão do gene de PDI em condições de estresse do RE e revelaram uma resposta protetiva, indicando esta via como um potencial alvo terapêutico (BELMONT *et al.*, 2012; VEKICH *et al.*, 2012; PERRI *et al.*, 2015).

P58<sup>IPK</sup> (DNAJC3) é um membro da família de proteínas de choque térmico pertencente à família HSP40. Em células em repouso, localiza-se no citosol e durante o estresse do RE é transferida para o lúmen da organela. Sua principal função é na moderação da atenuação da tradução de proteínas globais, atuando na regulação da via PERK através da inibição da atividade deste sensor (RUTKOWSKI *et al.*, 2007).

A proteína BiP (HSPA5/GRP78), é uma chaperona que possui atividade reguladora central da função do RE devido ao seu papel não somente na dobragem e montagem de proteínas e encaminhamento de proteínas para a degradação, como também no controle e ativação dos sensores de estresse transmembranares do RE, contribuindo para a adaptação celular ao estresse por uma regulação positiva. A BiP é responsável pela detecção de regiões não dobradas, sendo o principal sistema de dobramento de proteínas não glicosiladas ou naquelas em que a glicosilação ocorre tardiamente (HENDERSHOT, 2004; LI & LEE, 2006; OTERO *et al.*, 2010). Em ensaios com objetivos farmacológicos, Kudo e colaboradores (2008), ao avaliar o papel de um indutor da expressão da chaperona BiP, o BIX [BiP (indutor de cadeia pesada de imunoglobulina) indutor X], mostraram que BIX reduziu morte celular em neuroblastoma induzida por estresse do RE e reduziu a área de infarto devido à isquemia cerebral em camundongos e atribuíram este efeito protetor à indução da expressão de BiP, que pode aumentar a capacidade de dobra do RE.

O aumento do nível de proteínas não dobradas no lúmen do RE resulta na dissociação da chaperona BiP de três proteínas transmembranares, denominadas PERK (*PKR-like ER kinase*), IRE1 (*Inositol-requiring enzyme1*) e ATF6 (*Activating transcription factor 6*) (BERTOLOTTI *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2003; RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004; SHEN *et al.*, 2004; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2005), que são subsequentemente ativadas por autofosforilação e oligomerização (PERK e IRE1) ou clivagem no aparelho de Golgi (ATF6). A ativação destas proteínas de sinalização inicia os vários mecanismos, desencadeados em resposta ao estresse do RE e compõe a via UPR, entre eles a inibição transitória da tradução global, a degradação das proteínas não dobradas e a indução de chaperonas moleculares para aumentar a capacidade de RE para dobrar proteínas. BiP/GRP78 se dissocia disparando a sinalização de cada resposta associada a

essas proteínas transmembranares e passam a auxiliar na dobragem das proteínas acumuladas (SHEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008; BORIUSHKIN *et al.*, 2014).

Em infecções virais, há uma sobrecarga de proteínas a serem processadas pelo RE, que ativa a condição de estresse do RE. Com isso há a ativação dos sensores da reposta UPR (PERK, IRE1 e ATF6), que irão atuar no sentido de reduzir os efeitos da acumulação dessas proteínas, na tentativa de restaurar a homeostase do RE, através da regulação de grupos específicos de genes envolvidos na UPR (HAMPTON, 2000, MORI, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2003; MEUSSER *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2005).

Assim como em doenças infecciosas, numerosas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer têm sido estudadas e as condições de estresse do RE e os processos de síntese e maturação de proteínas se mostrado cruciais para a sobrevivência e função celular. Com isso, há um interesse biomédico crescente na procura para investigar os mecanismos moleculares subjacentes à UPR e no desenvolvimento de estratégias para manipular esta via (YOSHIDA, 2007, KIM *et al.*, 2008; OZCAN & TABAS, 2012).

## 2.1 As três vias da UPR – Os Sensores do Estresse do Retículo Endoplasmático

### 2.1.1 Enzima 1 sequestradora de Inositol (*Inositol-requiring enzyme 1*) - IRE1

A IRE1 é uma glicoproteína transmembranar do tipo I (100 kDa) alocada no retículo endoplasmático, constituída por um domínio efetor citoplasmático/nuclear C-terminal, um domínio transmembrana (TM) e um domínio quinase N-terminal associado pela sua porção amino terminal à chaperona BiP/GRP78, voltado para o lúmen desta organela, que é sensível ao reconhecimento de proteínas não dobradas (COX *et al.*, 1993; URANO *et al.*, 2000). Em mamíferos existem duas isoformas de Ire1, sendo a principal diferença o padrão de expressão: Ire1- $\alpha$  com expressão ubíqua e Ire1- $\beta$  expresso nas células epiteliais intestinais (HOLLIEN *et al.*, 2009). Além disso, IRE1 $\alpha$  está associada a pro-sobrevivência da célula, tendo como principal alvo o processamento de XBP1. Já IRE1 $\beta$  ativa mecanismos pró-apoptóticos, tendo como alvos RNA ribossômico ou mRNA específicos (OIKAWA *et al.*, 2012).

Em condições de homeostase, a IRE1 está associada à BiP / GRP78, que a mantém inativa. Em situações de estresse do RE, com o acúmulo de proteínas desdobradas, a chaperona BiP/GRP78 se dissocia de IRE1, ocorre oligomerização e fosforilação dos domínios cinase justapostos, o que promove uma mudança conformacional e ativação de IRE1 que pode ativar tanto programas de pró-sobrevivência quanto pró-apoptóticos (HARDING, *et al.*, 2000a; OSLOWSKI & URANO, 2011; GARDNER & WALTER, 2011; KORENNYKH *et al.*, 2011). Essa ativação também pode ocorrer devido à ligação a proteínas não formadas diretamente no domínio luminal de IRE1 (BERTOLOTTI *et al.*, 2000) que culmina com a ativação do seu domínio RNase e clivagem endonucleásica de seu substrato XBP1 (X-box binding protein-1), denominação dada para este gene em metazoários. Este, por sua vez, ativa promotores de genes que codificam chaperonas e outros alvos da UPR (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002).

O processamento pós-transcricional do mRNA do fator de transcrição XBP1 (X-box binding protein 1) (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002) gera a clivagem do mRNA alvo pela IRE1 ativada em dois pontos, culminando na excisão de um intron de 26 nucleotídeos (HETZ *et al.*, 2011; JURKIN *et al.*, 2014). A forma processada ou “*spliced*” (XBP1s) é traduzida num fator de transcrição de 41 kDa, uma molécula estável e

potente ativador de genes alvos da UPR. No entanto, a forma não processada ou “*unspliced*” (XBP1u) do mRNA de XBP1 também é traduzida em alguns organismos, dando origem à molécula pouco estável e repressora de genes alvos da UPR. Esta proteína também é produzida em outros pontos da via UPR, pelo braço ATF6, que atua como um fator de transcrição aumentando os níveis de XBP1, em condições de estresse do RE (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002). Os níveis de XBP1 permanecem elevados mesmo com a diminuição do estresse do RE e inativação do sensor IRE1. Com isto, o mRNA de XBP1 permanece na sua forma precursora, não processada, e passa a atuar como inibidor da sinalização de XBP1 (YOSHIDA, *et al.*, 2006).

O eixo de sinalização IRE1-XBP1 modula as respostas pró-sobrevivência, visando muitos genes envolvidos na dobragem e maturação das proteínas, degradação associada ao RE (ERAD) e remodelamento de membrana (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002; JURKIN *et al.* 2014;) pela modulação da síntese de fosfolipídios que é necessária para a expansão do RE em condições de estresse. São exemplos de genes alvo de XBP1 o P58<sup>IPK</sup>, genes semelhantes a DnaJ / Hsp-40, BiP/GRP78 e proteína dissulfureto isomerase (PDI) (LEE *et al.*, 2003a).

Outra função da IRE1, em ativação distendida deste sensor, é a degradação de mRNA associados a membrana, processo denominado de Decaimento regulador dependente de IRE1 (*Regulated IRE1 dependent decay*, RIDD), com isto, a maquinaria para tradução e translocação celular é disponibilizada para as proteínas induzidas pela UPR. Esta resposta, em conjunto com a regulação de promotores de vários genes envolvidos no transporte de proteínas não dobradas do RE para citosol e de degradação de proteínas (RAO & BREDESEN, 2004) somada a ações de outros componentes da via UPR, contribuem para a redução global de proteínas, aliviando a sobrecarga no RE (HOLLIEN *et al.*, 2013).

Uma vez não reestabelecida a homeostase no RE, a ativação prolongada de IRE1 pode induzir apoptose através da ligação à proteína adaptadora TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) que ativa ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) e a via de JNK (*cJun-N terminal kinase*) que impulsiona a ativação de componentes, como Caspase 12, Bax e Bak envolvidos na apoptose (RON & WALTER, 2007; SCHRÖDER &

KAUFMAN, 2006; XU *et al.*, 2005). Além do mais, a ativação de IRE1, inicia uma variedade de sinalizações através da ligação de TRAF2 e outras proteínas adaptadoras; como sequestro de IKK e indução de sinalização via NF- $\kappa$ B. Esses eventos desencadeiam a ativação de cinases ASK1/JNK, ERK, e p38, que podem regular apoptose e autofagia (HETZ & GLIMCHER, 2009).

### **2.1.2 Proteína Cinase Residente no Retículo Endoplasmático semelhante à PKR – PERK**

PERK é uma proteína transmembranar do tipo I, localizada no RE, com um domínio cinase, homóloga a outras cinases do fator de iniciação de tradução eucariótico 2 (eIF2) também conhecida como eIF2AK3 (SHI *et al.*, 1998; HARDING *et al.*, 1999). Localiza-se na membrana do retículo endoplasmático em condições homeostáticas, na sua forma monomérica inativa, pela associação do seu domínio luminal com a chaperona BiP/GRP78. Na fase inicial do estresse do RE, o acúmulo de proteínas não dobradas conduz à dissociação de Bip (ou GRP78) que possibilita a homodimerização de PERK e sua autofosforilação com ativação do domínio cinase (HARDING *et al.*, 2000b; OSLOWSKI & URANO, 2011) levando à ativação de uma via de resposta que atua na diminuição da síntese proteica global e ativação dos fatores de transcrição pro-apoptótico.

Uma vez ativada, PERK reconhece e fosforila a subunidade alfa do fator de iniciação da tradução em eucariotos (eIF2 $\alpha$ ) responsável por carrear a metionina inicial e dar início à tradução proteica. Com os níveis de eIF2 $\alpha$  ativo reduzidos há diminuição da iniciação da tradução do mRNA e, conseqüentemente, a diminuição global da síntese de proteínas.

Além da redução da síntese de proteínas da carga do RE, a ativação da via PERK-eIF2 $\alpha$  também contribui para indução da transcrição de genes associados à via UPR. A fosforilação de eIF2 $\alpha$  ativa a tradução do fator de transcrição 4 (ATF4), que regula os promotores de vários genes implicados na via UPR, controlando a expressão de chaperonas e de proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e no processo

redox e morte celular, como as proteínas CHOP (proteína homóloga do fator de transcrição C/EBP) envolvida na ativação de apoptose mediada pelo estresse do RE (HARDING 2000b; Lu *et al.*, 2004) e GADD34 (*Growth Arrest DNA Damage Inducible*) uma molécula com função regulatória da via (HARDING *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2010).

A via de eIF2 $\alpha$ -P/ATF4 tem efeito citoprotetor, direcionando a expressão gênica para limitar ou reverter o dano celular causado pelo estresse. Contudo, uma vez não controlado o estresse a resposta UPR será direcionada para a programação de morte celular (HARDING *et al.*, 2000b; HAYNES *et al.*, 2004). A ativação de PERK é reversível por mecanismos fisiológicos em estágios tardios da via UPR.

A proteína CHOP (GADD153/DDIT3) é uma proteína de 29 kDa, composta por um domínio amino-terminal de ativação transcricional, que pode ser ativado em condições de estresse do RE com função importante na regulação da morte celular. Sua transcrição ocorre via ATF4, cuja proteína se liga e ativa o promotor de CHOP (HARDING *et al.*, 2000b; MA *et al.*, 2002). A proteína CHOP é ativada por uma quinase, denominada p38, e em estágios mais tardios atua no processo de indução de morte celular, síntese e oxidação de proteínas no retículo endoplasmático estressado. CHOP pode ativar a transcrição de Ero1L (ER- oxidorreductina 1 $\alpha$ ), uma oxidase que catalisa a formação de dissulfeto, podendo atuar no processamento proteico, contudo pode atuar como uma molécula pró-apoptótica pela ativação do canal de liberação de cálcio IP3R1 do ER via formação de ligação dissulfeto em uma alça luminal de IP3R1 e definição de um ambiente de hiperoxidação que leva à morte celular. O controle desta via pode ser feito pela ubiquitinação e degradação de Ero1L mediada por FBXO6 (Proteína F-box 6), o que inibe a apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (CHEN *et al.*, 2016). Além disto, CHOP ativa GADD34 (*Growth Arrest DNA Damage Inducible*) que promove a inversão da repressão traducional causada por eIF2 $\alpha$  ativada por UPR. CHOP pode promover a morte celular pela indução direta de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), pelo aumento de Ero1L ou através do aumento dos níveis da fosfatase GADD34, pela restauração da tradução, uma vez que isto leva à exarcebação do estresse oxidativo pelo aumento da carga de proteínas a serem processadas pelo RE (ZINSZNER *et al.*, 1998; MARCINIAK, *et al.*, 2004).

GADD34 codifica uma subunidade reguladora de um complexo contendo proteína fosfatase 1 (PP1c) e controla a repressão da expressão gênica induzida pelo estresse induzindo a desfosforilação de eIF2 $\alpha$  na resposta tardia da via de PERK. Estudo utilizando inibidor seletivo da atividade da fosfatase GADD34, que promoveu o bloqueio da desfosforilação de eIF2 $\alpha$  mostrou efeito citoprotetor, sugerindo que inibidores químicos seletivos da desfosforilação de eIF2 $\alpha$  podem ser úteis como alvos moleculares terapêuticos em condições de estresse de ER (BOYCE *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2010).

Outra molécula envolvida no mecanismo de controle da atividade de PERK sobre a tradução de mRNAs é a p58<sup>IPK</sup>, membro da família de chaperonas DNAJ. Isso ocorre pela ligação da co-chaperona p58<sup>IPK</sup> no domínio cinase da enzima PERK a fim de inibir a sua atividade, permitindo a recuperação da tradução de mRNAs após o estresse do RE. Ademais, evidências sugerem que o p58<sup>IPK</sup> pode modular a apoptose e as respostas inflamatórias em condições de infecções e estresse do RE provavelmente através da inibição destas cinases. O aumento de p58<sup>IPK</sup> por indução de estresse do RE em modelo de infecção por adenovírus em camundongo revelou redução do vazamento vascular e diminuição dos fatores pró-apoptóticos e pró-inflamatórios em células endoteliais da retina em camundongos diabéticos (YANG *et al.*, 2011). É sugerido que o controle desta via por p58<sup>IPK</sup> é importante para garantir a sobrevivência celular, que caso não fosse controlada, poderia causar danos maiores à célula. (HARDING, *et al.*, 2000a; RUTKOWSKI *et al.*, 2007; BOYCE *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008; BORIUSHKIN *et al.*, 2014). A inibição de PERK através da ligação ao seu domínio cinase impede a atividade de fosforilação de eIF2 $\alpha$  e por consequência a ativação de CHOP (VAN HUIZEN *et al.*, 2003) além disso, também impediria a degradação de proteínas que é ativada por esta via (CHAKRABARTI *et al.*, 2011).

Durante uma infecção viral, a ativação de PERK atenua a síntese de proteínas por fosforilação de eIF2 $\alpha$ , numa tentativa de impedir a produção das proteínas virais. No entanto, a infecção viral pode restaurar a síntese de proteínas globais em células hospedeiras influenciando p58<sup>IPK</sup> que ao suprimir a atividade de PERK resulta na recuperação da síntese proteica. PERK é um importante sensor de estresse do RE e pode regular a tradução de proteínas de forma geral. Assim, a inibição de PERK e,

consequentemente, de eIF2 $\alpha$  por p58<sup>IPK</sup> reativa a via de produção de proteínas, inclusive as virais (MELVILLE, *et al.*, 1997; YAN *et al.*, 2002; VAN HUIZEN *et al.*, 2003; GOODMAN *et al.*, 2007).

Pelo exposto, destaca-se que maiores estudos sobre a forma de regular a atividade de fatores moduladores do estresse por UPR pela via de PERK, como o p58<sup>IPK</sup>, podem conduzir à descoberta de novas abordagens terapêuticas para o alívio de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, malignas e infecciosas (YANG *et al.*, 2011; HETZ *et al.*, 2013; BORIUSHKIN *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Fator de Transcrição 6 - ATF6

ATF6 (*activating transcription factor 6*) é uma proteína transmembranar de tipo II, de 670 aminoácidos, constitutivamente expressa como uma proteína de 90 kDa (p90ATF6). Possui um domínio C-terminal localizado no RE e um N-terminal localizado no lado citosólico. Existem duas isoformas de ATF6: ATF6 $\alpha$  e ATF6 $\beta$ . Embora as duas isoformas possam ligar-se aos mesmos elementos reguladores elas exibem características de ativação e estabilidade transcricionais específicas. Ambas possuem domínios b-Zip altamente conservados, que lhes permitem ligar-se a ERSEs como homo ou heterodímeros, mas possuem regiões N-terminal com constituição de aminoácidos diferentes. Isto dá origem a um ativador de transcrição forte e rapidamente degradado, o ATF6 $\alpha$ , enquanto  $\beta$  é um fraco ativador de degradação lenta (THUERAUF *et al.*, 2007).

Em homeostase estas formas são mantidas inativadas pela associação à GRP78/Bip na porção N-terminal. Em condições de estresse do RE, Bip se dissocia de ATF6, que é translocada para o Complexo de Golgi, onde é clivado em uma proteína N-terminal de 50 kDa (p50ATF6) por proteases sítios 1 e 2 (SP1 e SP2). Os fragmentos N-terminais resultantes (N-ATF6 $\alpha$  e N-ATF6 $\beta$ ) conservam domínios de ligação a DNA. N-ATF6 $\alpha$  e N-ATF6 $\beta$  translocam-se para o núcleo e funcionam como importantes fatores de transcrição, e podem se ligar, como homo ou heterodímeros, a elementos reguladores específicos e influenciam a expressão de genes de elementos de resposta ao estresse do RE (ERSE), que contribuem para a resolução do estresse, aumentando assim a viabilidade celular (HAZE *et al.*, 1999; YE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002; TARDIF *et al.*,

2002; THUERAUF *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2007). N-ATF6 $\alpha$  também pode se ligar a XBP1, formando um heterodímero, que podem se ligar a elementos de resposta ao estresse ou de ativação da UPR, para o controle da ativação de componentes de degradação associados a ER (YOSHIDA *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Alguns dos genes alvo de ATF6 incluem EDEM1 (*ER-degradation enhancing-mannosidase-like protein 1*), as chaperonas GRP78, CHOP, PDI e outras proteínas UPR, como a proteína XBP1. Todas essas proteínas trabalham em estreita colaboração para reduzir as proteínas não dobradas no lúmen do RE (YOSHIDA *et al.*, 2001; BELMONT *et al.*, 2008; SOVOLYOVA *et al.*, 2014). O aumento na atividade de chaperonas e na degradação de proteínas não dobradas é importante para o controle de qualidade das proteínas formadas e para a manutenção da homeostase do RE e a sobrevivência celular. A UPR ativa várias vias que atuam também em conjunto, como por exemplo, o ATF6 potencializa a atuação da resposta pela via de IRE1, com a indução da transcrição de XBP1, que será processada pela atividade de endoribonuclease de IRE1 (YE *et al.*, 2000; BORIUSHKIN *et al.*, 2014).

A sinalização ATF6 é principalmente pro-sobrevivência, mas em caso de estresse prolongado, a sinalização ATF6 ativa a proteína homóloga pro-apoptótica CHOP (YOSHIDA *et al.*, 2001). Além disto, ATF6 pode levar a ativação de morte programada pela inibição específica de Mcl-1 (um fator anti-apoptótico) fazendo com que as células fiquem susceptíveis à apoptose. Estudos mostram que essa ativação parece ocorrer na presença de níveis mais elevados de ATF6, enquanto níveis mais baixos pendem para a sobrevivência, caracterizando a dualidade de ATF6 frente ao estresse celular (MORISHIMA *et al.*, 2011). Neste caso, se a homeostase de RE é severamente prejudicada e o estresse não pode ser resolvido, a sinalização muda de pro-sobrevivência para pró-apoptótica a fim de eliminar a célula danificada do organismo. A indução de apoptose poderá ser acionada por todas as vias, por PERK e ATF6 através da ativação transcricional do gene para CHOP (MATSUMOTO *et al.*, 1996), por IRE1 da via IRE1-TRAF2-ASK1 MAP-quinase, (XIA *et al.*, 1995; URANO *et al.*, 2000) e pela ativação de caspases (NAKAGAWA *et al.*, 2000; BURIKHANOV *et al.*, 2009) levando à morte celular.

## 2.2 Via UPR e Infecções Virais

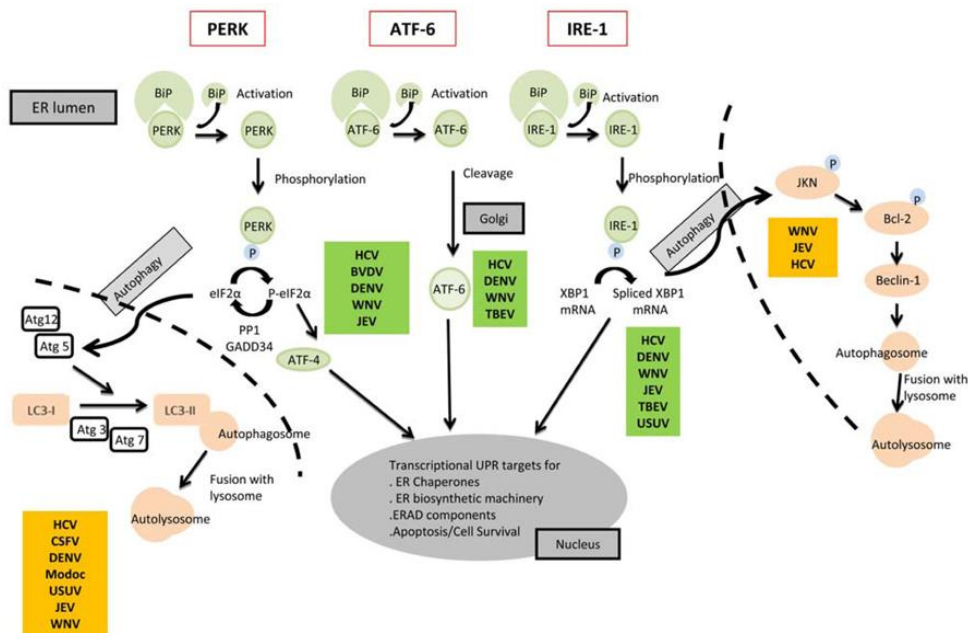
Estudos acerca das interações vírus-hospedeiro buscam revelar as interações do ciclo de vida do vírus com as organelas celulares e as vias de sinalização. É de extrema relevância decifrar a complexidade dessas interações para o controle de patógenos virais. Vários estudos vêm demonstrando as interações dos flavivírus com o retículo endoplasmático (RE) e as vias celulares de resposta da proteína desdobrada (UPR).

Durante a permanência do vírus na célula, a etapa de produção das proteínas virais, bem como dobramentos, modificações pós traducionais e formações de complexos proteicos são feitos no retículo endoplasmático. Os vírus, em sua ampla maioria, não têm as proteínas com as funções executadas por chaperonas e dependem dessas proteínas presentes na célula hospedeira para dobrar as proteínas virais, o que aumenta a sobrecarga de processamento de proteínas pelo RE. Em resposta ao estresse causado, as células que expressam replicons virais induzem a resposta denominada UPR (TARDIF *et al.*, 2002). Envolvidas na regulação destas vias, as proteínas virais têm sido identificadas como importantes fatores de regulação da UPR, como por exemplo, a proteína NS4B e a proteína do envelope do HCV foram associadas à regulação da sinalização de UPR (ZHENG *et al.*, 2005, LI *et al.*, 2009), ativação de IRE1/XBP1 e aumento da expressão de BiP (CHAN & EGAN, 2005).

Em estudo com *Chikungunya vírus* (CHIKV), um alfavírus da família *Togaviridae*, foi detectado a ativação somente de ATF6 e IRE1, em contraste à supressão de PERK pela ligação e inibição da fosforilação de eIF2 $\alpha$  (RATHORE & VASUDEVAN, 2013).

Os vírus evoluíram de forma a subverter a resposta das vias de sinalização da UPR do hospedeiro e promover a tradução das proteínas virais e garantir a permanência da infecção (CHAN & EGAN, 2005, TARDIF *et al.*, 2005; KE & CHEN, 2011; AMBROSE & MACKENZIE, 2013b, GREEN *et al.*, 2013). Vários estudos têm contribuído cada vez mais para explicitar os mecanismos envolvidos no processo de infecção, especialmente dos vírus da família *Flaviviridae*, e alguns representantes, como HCV, BVDV, DENV, WNV, JEV, TBEV e USUV (Figura 10). A presença da infecção mostrou modular um ou mais dos três braços da UPR (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014), como por exemplo, a indução do aumento da expressão de BiP e processamento de XBP1 pela ativação de IRE1 (TARDIF

*et al.*, 2004; SHINOHARA *et al.*, 2013), clivagem de ATF6 (TARDIF *et al.*, 2002, LI *et al.*, 2009), fosforilação de eIF2α e indução da expressão de fatores pro-apoptóticos como CHOP (CHAN & EGAN, 2005; JORDAN *et al.*, 2002).



**Figura 10: UPR e ativação por vírus.**

A infecção por vírus da família *Flaviviridae* pode ativar várias partes da via UPR de forma diferentes entre os tipos virais. A via PERK pode ser induzida pelos vírus HCV, BVDV, DENV, WNV e JEV, pela ativação da fosforilação de eIF2α; já a via ATF6 é ativada por HCV, DENV, WNV e TBEV, induzindo a clivagem de ATF6 na sua forma ativa; enquanto a via IRE1 é ativada por HVC, DENV, WNV, JEV, TBEV e USUV, induzindo o “*splicing*” de XBP-1, para formação do seu mRNA que será traduzido na proteína XBP-1 funcional. A ativação destas vias pode, consequentemente, levar à autofagia. Fonte: adaptado de BLÁZQUEZ *et al.*, 2014.

A alta demanda de proteínas a serem processadas pelo retículo endoplasmático durante a infecção pode levar ao acúmulo de proteínas não dobradas causando o estresse dessa organela e a ativação de vias de transdução de sinais, com consequente aumento da expressão de componentes do sistema de degradação associado ao RE (ERAD), síntese de chaperonas e aumento do tamanho da organela, entre outros efeitos, na busca pela restauração da homeostase. Algumas respostas à UPR, tais como a expressão de chaperonas e a regulação do metabolismo, podem ser úteis à replicação viral. Ao contrário, a atenuação de síntese de proteínas e o

desencadeamento da morte celular por apoptose, comprometem a replicação viral (IRANPOUR *et al.*, 2016). Em experimentos com modelos de infecção por diferentes vírus, demonstrou-se modulação da UPR, através da ativação de múltiplas vias que conduzem à ativação transcricional de vários genes associados a resposta à UPR. No entanto, como os sensores da UPR reconhecem a infecção viral para ativar essas vias não está completamente elucidado. (YU *et al.*, 2006; MEDIGESHI *et al.*, 2007; UMAREDDY *et al.*, 2007; AMBROSE & MACKENZIE, 2010; AMBROSE & MACKENZIE, 2013a; RATHORE & VASUDEVAN, 2013; FRASER *et al.*, 2014). Alguns estudos em *Flavivirus* têm demonstrado que há a modulação destas vias em diferentes pontos da UPR e que ela pode ocorrer de forma específica de acordo com o tipo viral e o tempo da infecção.

No caso do WNV, o vírus mostrou ativar a resposta UPR em vários pontos da via, como no aumento da transcrição e no processamento de XBP1. A ativação da UPR também aumentou a produção de chaperonas, a biogênese da membrana e a ativação de ATF6, beneficiando a replicação viral. Ademais foi observado a ativação de um mecanismo hospedeiro para combater a infecção pelo WNV com ativação da morte celular dependente de CHOP. Além disso, foram descritas diferenças em relação à regulação do braço PERK da UPR, em modelos de infecção utilizando vírus WNV atenuado, que não induziu a inibição da tradução mediada por PERK e a transcrição de CHOP (AMBROSE & MACKENZIE, 2010) em contraste ao WNV neurovirulento, que regulou positivamente todas as três vias da UPR (MEDIGESHI *et al.*, 2007). A indução da fosforilação de eIF2 $\alpha$  e, conseqüentemente, a regulação de fatores apoptóticos tais como CHOP e GADD34 são mecanismos do hospedeiro utilizados para limitar a replicação viral (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014). Em adição, células deficientes em ATF6 mostraram uma diminuição na produção de proteína e de virions quando infectadas com WNV (AMBROSE & MACKENZIE, 2013a), mostrando que na ausência de ATF6, as outras cascatas de sinalização UPR, PERK e IRE1, não puderam ativar ou aumentar a produção de vírus, o que enfatizou a importância de ATF6 para a replicação deste vírus (MEDIGESHI *et al.*, 2007; AMBROSE & MACKENZIE, 2010; AMBROSE & MACKENZIE, 2013a).

Para DENV, estudos demonstraram que diferentes sorotipos de DENV modulam de forma diferente as vias de UPR. Os quatro sorotipos convergem em relação ao aumento da produção de algumas moléculas como BiP/GRP78, GADD34, CHOP, XBP1 e eIF2 $\alpha$ . No entanto, divergem quando se avalia o tempo de infecção, para DENV-2 e DENV-4 há uma queda da ativação destas moléculas em 48 horas após a infecção (hpi), que é mantida para DENV-1 e DENV-3. Já o nível de fosforilação de eIF2 $\alpha$  mantém-se elevado para estes dois últimos sorotipos, mesmo após 48 hpi (UMAREDDY *et al.*, 2007; PARADAKAR *et al.*, 2011; FRASER *et al.*, 2014). Em outro estudo, foi visualizada a indução do processamento de XBP1 pela proteína não estrutural NS2B em infecção com DENV-2 (YU *et al.*, 2006). Pena e Harris (2011) demonstraram que em infecção por DENV há a ativação das vias UPR dependente do estágio da replicação, com a ativação de PERK e a fosforilação de eIF2 $\alpha$  durante os estágios iniciais de replicação e subsequente desligamento, e posterior ativação de IRE1 e ATF6 em estágios mais avançados do ciclo de replicação. Ao passo que a inibição da desfosforilação de eIF2 $\alpha$  pelo fármaco Salubrinal reduziu a infecção viral (UMAREDDY *et al.*, 2007; FRASER *et al.*, 2014). Para o mesmo vírus também foi descrita a ativação da expressão de GADD34 e CHOP e ativação de apoptose (UMAREDDY *et al.*, 2007). Os níveis de RNAm de GADD34 foram regulados positivamente no decurso da infecção tardia por DENV. Esta molécula promove a desfosforilação do eIF2 $\alpha$  e, portanto, serve como mecanismo de feedback negativo para desencadear a recuperação da parada da translação. No entanto, a inibição de PERK nas fases iniciais da infecção, apesar de induzir a repressão da tradução do hospedeiro, parece não afetar os níveis de proteína viral por ativar outras vias de regulação da tradução que contribuem para a produção de partículas de DENV (ROTH *et al.*, 2017).

*Zika virus*, especialmente, tem demonstrado modular a via UPR em modelos distintos, *in vitro* e *in vivo* (AMORIM *et al.*, 2017, GLADWYN-NG *et al.*, 2018, TAN *et al.*, 2018). Gladwyn-Ng e colaboradores (2018), utilizando uma amostra de origem asiática (H/PF/2013, GenBank: KJ776791.1) do ZIKV mostraram que há o estresse do RE e ativação de UPR tanto em amostras corticais pós-morte de fetos humanos quanto em culturas de células-tronco neurais humanas (24 hpi) infectados com ZIKV, com ativação modesta de IRE1-XBP1 e regulação positiva de PERK-ATF4, bem como aumento na

produção de algumas chaperonas, como calregulina e PDI. Em contrapartida não observaram a ativação do braço ATF6 da via UPR. Em modelo *in vivo*, no mesmo estudo, foi observada a restauração da neurogênese cortical em experimento utilizando inibidores de PERK, por diminuir ativação de apoptose, ou de IRE1, por diminuir a replicação do vírus e também por prevenir a ativação de PERK-ATF4, o que sugeriu uma regulação cruzada entre estas vias.

*Tan e colaboradores* (2018), utilizando outra amostra de origem asiática (Zika virus/SZ01/2016/China, GenBank: KU866423.2) em 24 hpi e 48 hpi, em modelos de células neuronais humanas e em camundongos deficientes de receptores para INF-I e INF-II, identificaram o aumento da transcrição de vários genes dos três braços da via UPR: BIP, ATF6, fosfo-eIF2 $\alpha$ , XBP1, ATF4, GADD34, CHOP e EDEM-1 processada aumentaram significativamente *in vivo*. Além disto, detectaram a translocação de XBP1 e ATF6 para o núcleo infectados cinco dias após a infecção, em cérebro de camundongos, indicando ativação destas vias. Contudo, em modelos celulares distintos foram traçados perfis de modulação de UPR diferentes. Equanto BIP, fosfo-IRE1, ATF4 e ATF6n aumentaram significativamente em 48 hpi em apenas uma das linhagens estudadas. Para ambas as linhagens foram detectados o aumento de fosfo-eIF2 $\alpha$ , o processamento de XBP1 e aumento da expressão de GADD34 e CHOP.

Além destes, outro estudo, utilizando amostra asiática (PRVABC59, GenBank: KU501215.1) e 24 hpi, detectou que na infecção por ZIKV há aumento moderado na expressão de GADD34 e atenuação da fosforilação de eIF2 $\alpha$ , o que sugere a indicação da regulação da via de PERK por este vírus como uma tentativa de controle da resposta ao estresse. No mesmo estudo, o tratamento com salubrinal, um inibidor da desfosforilação de eIF2 $\alpha$ , mostrou diminuição na produção de partículas infecciosas reafirmando a importância da modulação de eIF2 $\alpha$  para a replicação do ZIKV (*AMORIM et al.*, 2017).

Já *Roth e colaboradores* (2017), em infecção com amostra de origem asiática (H/PF/2013, GenBank: KJ776791.1) e de origem africana (MR766, GenBank: MK105975.1) demonstraram em experimentos *in vitro* que há repressão da iniciação da tradução da célula hospedeira durante a infecção, enquanto a síntese da proteína viral permanece inalterada, sendo que a amostra asiática induziu uma repressão da

tradução mais lenta, em 72hpi e a amostra africana induziu uma redução logo em 18 hpi. Além disto, mostraram que a suspensão da tradução não estava estritamente ligada à fosforização de eIF2 $\alpha$ , indicando outros caminhos de análise dos efeitos da infecção na célula.

A importância da UPR na infecção pelo ZIKV também tem sido demonstrada como determinante na evolução da doença, como, por exemplo no desenvolvimento de microcefalia. Estudos mostraram que a infecção pelo ZIKV em progenitores do neurônio cortical acarretou em alto estresse do retículo endoplasmático (ER) e resultou no bloqueio de neurogênese e na morte apoptótica neuronal, o que levou à microcefalia cortical. Em adição, a administração de moléculas inibitórias da via UPR preveniu a microcefalia cortical induzida pelo ZIKV. Com isto, o contexto do controle da UPR pelo ZIKV mostra ter uma relevância mais ampla, uma vez que não só garante a replicação viral e o espalhamento da infecção, mas está associado à evolução e a gravidade da doença, por ser responsável também pelos sintomas neurológicos causados pelo ZIKV (GLADWYN-NG *et al.*, 2018; ALFANO *et al.*, 2019).

O papel da UPR durante as infecções por flavivírus tem sido associado a fatores que contribuem para o estabelecimento de um ambiente mais favorável para a replicação viral, tais como: expressão de chaperonas, para que consiga manter o dobramento das proteínas virais; biogênese de membrana, com a adaptação da organela ao volume de proteínas a serem processadas; ou produção de transportador de antioxidantes e aminoácidos mediada por ATF4. Ainda assim, alguns efeitos da UPR tais como a inibição da tradução, a degradação de mRNA, a produção de proteínas de degradação ou a indução de apoptose não são necessariamente benéficos para a replicação viral (AMBROSE & MACKENZIE, 2013b). A regulação da síntese de proteínas pela fosforilação de eIF2 $\alpha$ , por exemplo, desempenha um papel importante na defesa celular contra a infecção viral. Contudo, os vírus vêm demonstrando a capacidade de desenvolver estratégias para prevenir o desencadeamento destes mecanismos celulares. A modulação que o Zika vírus exerce durante a infecção tem sido bastante estudada, no entanto, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas para o total esclarecimento dos mecanismos de controle destas vias e para a abertura de novos caminhos para o tratamento da doença.



## II – Justificativa



A Zika é doença infecciosa, causada por vírus do gênero *Flavivirus*, transmitido através da picada da fêmea do mosquito, em especial, *Aedes aegypti*. Apresentou nos últimos anos rápida expansão no Brasil e no mundo, atingindo 76 países, e tem chamado atenção das autoridades sanitárias por ter sido relacionada à complicações graves, como microcefalia congênita e Síndrome de *Guillain-Barré*.

De modo geral, a patogenia das infecções virais é estabelecida pelos efeitos da replicação viral e as respostas do hospedeiro à infecção. O estudo da interação dos vírus com as células do hospedeiro é de extrema importância, tendo em vista a obrigatoriedade de o vírus parasitar uma célula, para iniciar e completar seu ciclo de proliferação. O vírus necessita operar a maquinaria celular a fim de completar seu estágio de reprodução.

Os mecanismos regulatórios celulares que incluem a autofagia, apoptose e resposta à proteína não dobrada (UPR), possuem potencial para inspirar novas estratégias terapêuticas, uma vez que desempenham papéis críticos na infecção e replicação viral.

Estudar a interação entre o vírus e o hospedeiro e como ocorre a relação com as proteínas envolvidas na resposta ao estresse e uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes a três vias de adaptação - IRE1, PERK e ATF6 - e apoptose e o papel do estresse RE na doença, pode revelar uma nova visão de causa e apresentação da doença, levando a terapias mais eficazes para uma ampla gama de estados de doença (HOOPER *et al.*, 2012; CHUNYAN *et al.*, 2005).

Os controles destas vias de sinalização da resposta UPR como potenciais alvos terapêuticos são contemplados em vários trabalhos. Maiores estudos devem ser feitos neste sentido, bem como na revelação de terapias para outras condições de indução de respostas a UPR, como as infecções virais.

Pelo fato de se tratar de uma importante arbovirose, em um contexto com elevado número de casos, cuja expansão ocorreu em pouco tempo e a sua, cada vez maior, associação à evolução clínica de complicações graves, fica claro a necessidade do maior conhecimento a seu respeito, com o intuito não só de prevenir esses quadros, mas também de impedir o alastramento do vírus. Em especial, o estudo da regulação de vias celulares importantes que impactam o ciclo viral, em prol da contenção do

espalhamento do vírus no organismo através da inibição da sua replicação, tem revelado valiosos alvos terapêuticos. A identificação de alvos moleculares eficazes permitiria novas abordagens terapêuticas no combate das arboviroses, de grande importância, particularmente em casos de surtos como a epidemia do vírus Zika (IRANPOUR *et al.*, 2016).

Dessa forma, o completo entendimento da interação vírus-sistema é de grande importância para o aprofundamento das pesquisas no desenvolvimento de terapias mais eficazes para o controle das infecções virais.

Ademais, as vias de regulação da expressão de genes importantes no ciclo viral já vêm sendo estudadas por nosso grupo utilizando modelos de infecção pelo *Vaccinia vírus* (LEÃO, 2013), quando se demonstrou o impacto da infecção viral na ativação dos diferentes sensores da via UPR.

Embora alguns mecanismos de modulação da via UPR, bem como de outras respostas ao estresse celular, já tenham sido descritos para *ZIKV* estes ainda não foram completamente elucidados.

O conhecimento das estratégias usadas pelo *ZIKV* para modular a via UPR pode prover pistas importantes para o planejamento racional de fármacos. Além disso, a identificação destes mecanismos regulatórios possibilita novas perspectivas sobre o uso desses vírus ou proteínas codificadas por ele na terapêutica de algumas patologias relacionadas ao estresse do RE.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o controle de vias de resposta as proteínas não dobradas na infecção por Zika vírus.

## III – Objetivos



### 3. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da infecção por Zika vírus sobre a via de resposta a proteínas não dobradas.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- ✚ Analisar o efeito da infecção pelo vírus Zika, utilizando uma amostra de origem asiática e uma amostra de origem africana, sobre a ativação do braço ATF6 da via UPR
- ✚ Analisar o efeito da infecção pelo vírus Zika, utilizando uma amostra de origem asiática e uma amostra de origem africana, sobre a ativação do braço IRE1/XBP1 da via UPR
- ✚ Analisar o efeito da infecção pelo vírus Zika, utilizando uma amostra de origem asiática e uma amostra de origem africana, sobre a ativação do braço PERK da via UPR
- ✚ Avaliar a produção de chaperonas em células infectadas por *ZIKV*, utilizando uma amostra de origem asiática e uma amostra de origem africana.
- ✚ Comparar o perfil de expressão de RNAs mensageiros da UPR em células infectadas pelo *Zika virus*, utilizando amostra de origem asiática, em relação às células não infectadas.

## **IV – Materiais e Métodos**

## 4. Desenho do estudo

### 4.1 Amostra Viral

A amostra de Zika vírus de origem asiática, denominada ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1), foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Marli Tenório (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE).

A amostra de Zika vírus de origem africana, denominada MR766 (GenBank: MK105975.1), foi cedida gentilmente Prof. Dr. Davis Fernandes Ferreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ).

### 4.2 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho, bem como a descrição e a origem de obtenção estão listados no Quadro 1.

**Quadro 1: Plasmídeos utilizados no estudo. (Nome, descrição e fontes).**

Plasmídeos	Descrição	Origem
pCMVshort-ATF6-GFP	~5.3kb, high copy, vetor de expressão em eucariotos para ATF6 alfa com etiqueta GFP na porção N-terminal	Addgene, Cambridge, MA, EUA.
p5x-ATF6-GL3	pOFlucGL3 contendo 5 cópias de sítios de ligação do ATF6	Cedido gentilmente por Dr. Kazutoshi mori Kyoto University, Kyoto, JPN.
pRL-TK	Expressa a luciferase de Renilla sob o controle do promotor da timidina quinase do HSV-1.	Obtido comercialmente em PROMEGA.

### 4.3 Células

As células a serem utilizadas neste trabalho, bem como a descrição dos tipos celulares e a fonte de obtenção das mesmas, estão listadas no Quadro 2.

**Quadro 2: Células utilizadas no estudo. (Nome, descrição e fontes).**

<b>Células</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fonte</b>
C636	Linhagem celular de <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36	Banco de células do Rio de Janeiro – 0343
Vero	Células renais de macaco verde africano ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	ATCC® CCL-81™
T98G	Glioblastoma multiforme, <i>Homo sapiens</i> , humano	ATCC® CRL-1690™

#### 4.4 Iniciadores

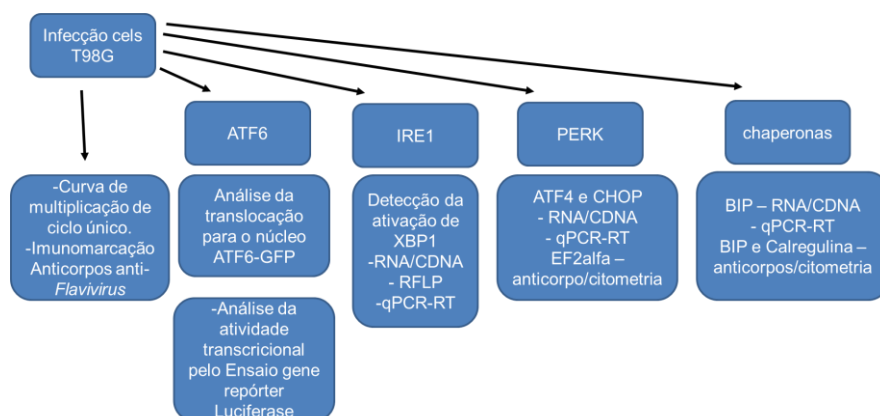
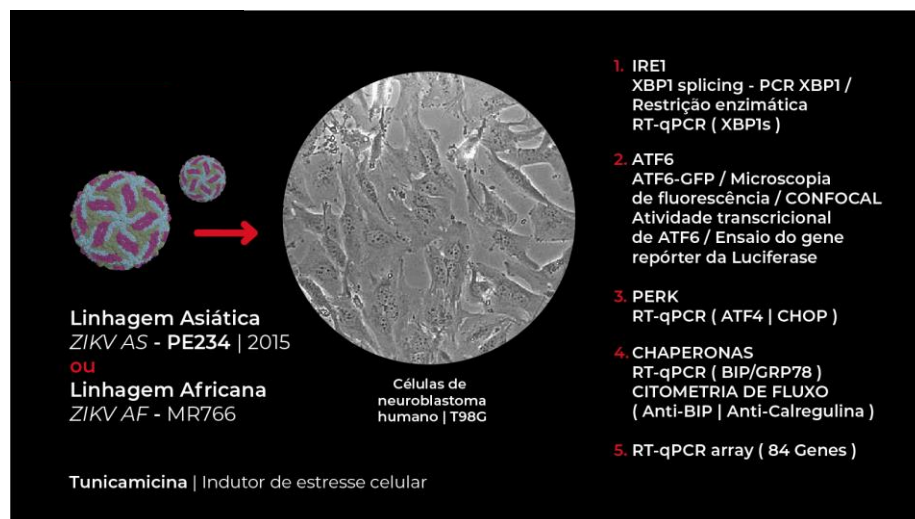
Os iniciadores utilizados neste trabalho, bem como suas sequências e referências, estão listados na Tabela 1:

Tabela 1: Relação e sequência dos iniciadores

Identificação	Sequência	Referência
ZIKV F	AGGATCATAGGTGATGAAGAAAAGT	Xu <i>et al.</i> , 2016
ZIKV R	CCTGACAACACTAAGATTGGTG	Xu <i>et al.</i> , 2016
B-actina F	GGCACCCAGCACAATGAAG	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
B-actina R	CCGATCCACACGGAGTACTTG	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
GAPDH F	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
GAPDH R	ACGACCAAATCCGTTGACTC	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
18SRNA F	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
18SRNA R	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
HPRT F	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
HPRT R	GAGCACACAGAGGGCTACAA	VALENTE <i>et al.</i> , 2009
hATF4 F	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA	OSLOWSKI e URANO, 2013
hATF4 R	ATCCTCCTTGCTGTTGTTGG	OSLOWSKI e URANO, 2013
hBIPF	TGTTCAACCAATTATCAGCAAATC	OSLOWSKI e URANO, 2013
hBIP R	TTCTGCTGTATCCTCTTCACCACT	OSLOWSKI e URANO, 2013
hCHOP F	AGAACCAGGAAACGGAAACAGA	OSLOWSKI e URANO, 2013
hCHOP R	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT	OSLOWSKI e URANO, 2013
hXBP1 spl F	TGCTGAGTCCGAGCAGGTG	SCHADEWIJK <i>et al.</i> , 2012
hXBP1 spl R	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG	SCHADEWIJK <i>et al.</i> , 2012
hXBP1total F	TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG	OSLOWSKI E URANO 2013
hXBP1total R	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG	OSLOWSKI E URANO 2013

#### 4.5 Delineamento experimental

As etapas para desenvolvimento deste trabalho foram apresentadas abaixo para melhor visualização de todo o processo (Figura 11).



**Figura 11: Delineamento experimental.**

Células T98G foram infectadas com vírus Zika da amostra asiática (ZIKAS) ou amostra africana (ZIKAF) e a infecção avaliada por curva de multiplicação de ciclo único em ensaio de placa e pela marcação com anticorpos anti-flavivirus (4G2). Uma vez detectada a permissividade à infecção foram avaliados os 3 braços da via UPR. Para avaliar ATF6 foi utilizada transfecção com plamídeo contendo ATF6 fusionado à proteína fluorescente verde (GFP) ou à luciferase, para detecção tanto da ativação de ATF6 pela translocação para o núcleo (presença de GFP no núcleo), quanto da atividade transcrional pela produção de luciferase. A ativação de IRE1 foi avaliada pela detecção do processamento de XBP1, por análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e por PCR quantitativa Real Time (qPCR-RT). O braço de PERK foi avaliado por qPCR-RT para detecção de ATF4 e por imunomarcagem de ELF2alfa em citometria. O aumento da produção de chaperonas foi checado por qPCR-RT e por citometria pela marcação com anticorpos específicos de BiP e Calregulina. Para verificação da expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta a proteínas não dobradas foram realizados adicionalmente ensaios de RT-qPCR em matriz contendo iniciadores específicos de 84 genes da via UPR.

## **5 MÉTODOS**

### **5.1 OBTENÇÃO DO ESTOQUE VIRAL E CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DO VIRUS ZIKA EM CÉLULAS T98G**

#### **5.1.1 Obtenção do ZIKV em células C6|36**

O Zika vírus foi obtido por expansão em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus* clone C636 a partir de infecção por 6 dias com multipicidade de infecção (MOI) de 0,1. Para tal, células C636 foram cultivadas em meio de meio Leibowitz (L-15) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), 2ug/ml de anfotericina B, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para infecção as amostras virais foram diluídas em meio Leibowitz L- 15 não suplementado, inoculadas em garrafas médias de cultura de células contendo monocamadas de células C636, com aproximadamente 70% de confluência, e incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionado 12 ml de meio Leibowitz L-15 suplementado. Após 6 dias de infecção, o sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação a 3000 g por 10 minutos, aliquoteado e armazenado para uso a -80°C. O título viral foi determinado por ensaio de titulação em células Vero, cultivadas em placa de seis poços.

#### **5.1.2 Cultivo celular das linhagens Vero e T98G**

As linhagens celulares Vero e T98G foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) suplementado com 10% de SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific Forma® Series II 3111 Water-Jacket CO<sub>2</sub> Incubator), até atingir a confluência de aproximadamente 80%. Para manutenção das células, a subcultura celular foi realizada a partir de culturas em garrafas de cultura celular e com 70-80% de confluência. A cada repique, o meio de cultivo foi descartado

com o auxílio de uma pipeta sorológica e para remoção completa do meio as células foram lavadas por duas vezes com 2mL de solução salina estéril fosfatada e tamponada - PBS1X - (1,5 mM NaCl; 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) . Em seguida, removeu-se a solução salina e foram adicionados 2 mL de solução de tripsina/EDTA (GIBCO). As garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C até que houvesse o total descolamento da monocamada celular. Após a tripsinização, as células foram coletadas em tubos contendo cerca de 5mL de meio de cultura (DMEM 10% SFB) e centrifugadas a 1250 g por 5 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemanha). As células foram solubilizadas em 1mL de meio DMEM 10% SFB por pipetagem, transferidas para novas garrafas previamente identificadas e posteriormente incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.1.3 Infecção em células T98G**

Células T98G foram cultivadas em garrafas de cultura celular para a manutenção de culturas celulares viáveis para os experimentos de infecção viral. Para produção das placas de ensaio contendo as células T98G, o meio DMEM nas garrafas foi descartado, e a monocamada de células lavada com solução salina PBS1X. Em seguida, 2 mL de solução de tripsina foram adicionados às garrafas de cultivo celular para soltar completamente a monocamada celular.

A suspensão celular foi transferida para um tubo e centrifugada durante 5 minutos a 1.250g, o sobrenadante descartado e o sedimento de células solubilizado em 1ml de meio DMEM contendo 10% de SFB. A quantidade de células total foi estimada utilizando-se Câmara de Neubauer, para distribuição de  $1 \times 10^5$  células por poço, em placa de 12 poços. As células foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, foi realizada a infecção da monocamada celular utilizando-se a diluição dos vírus com MOI igual a 1 em meio DMEM contendo 2,5% de SFB. A infecção é mantida sob incubação por 2 horas, em estufa a 37 °C e controle de 5% de CO<sub>2</sub>. As monocamadas de células foram lavadas por duas vezes com PBS1x e adicionado meio DMEM contendo 5% de SFB. As placas contendo as células infectadas

foram mantidas em estufa a 37 °C e controle de 5% de CO<sub>2</sub> nos períodos determinados em horas após a infecção (4, 24, 48, 72 e 96 horas). Além dos vírus foi adicionado como controle positivo, um inibidor da *N-glicosilação* e indutor clássico da UPR, a tunicamicina. A tunicamicina foi adicionada em uma concentração final de 1µg/mL por um período de 24 horas, em incubação a 37 °C e controle de 5% de CO<sub>2</sub>. Para controle negativo do experimento (mock) as células T98G foram incubadas com meio DMEM contendo 2,5% de SFB.

Para os ensaios subsequentes, em cada período, os sobrenadantes foram coletados para posterior uso nos experimentos de Curva de multiplicação e as células foram coletadas, por raspagem da monocamada, para extração do RNA e produção de cDNA. Todas as amostras foram armazenadas em ultrafreezer -80°C, até o momento do uso.

#### **5.1.4 Detecção da infecção de células T98G pelo ZIKV em ensaio de curva de multiplicação**

Para análise da infectividade das células T98G por *Zika virus* foi realizado um ensaio de curva de multiplicação, no qual, as amostras virais foram diluídas e inoculadas em placas de 12 poços contendo monocamadas de células T98G em MOI 1, em diferentes tempos de infecção (24, 48, 72, 96 e 120 horas), conforme descrito no item 5.1.3. Os sobrenadantes coletados foram utilizados para infecção em placas contendo monocamadas de células Vero. Para tal, os sobrenadantes são incubados por 2 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida o sobrenadante foi descartado, adicionou-se carboximetilcelulose (CMC) contendo 2% de SFB e as placas foram incubadas por 6 dias em estufa a 37 °C / 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, a monocamada celular foi fixada em paraformaldeído a 4% e coradas com cristal violeta. O ensaio foi fotodocumentado em equipamento ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad®)

Para tratamento dos dados em gráficos foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de placas (UFP) de cada tempo do ensaio em células T98G e feito o cálculo da quantidade por mililitro (UFP / mL).

### **5.1.5 Detecção da infecção de células T98G por ensaio de imunomarcação com anticorpos *anti-flavivírus***

Para análise da infecção em células T98G pelo *Zika virus*, além da curva de multiplicação, foi utilizado ensaio de imunomarcação pela marcação com anticorpos *anti-flavivírus* que se ligam às proteínas do envelope viral. Para tal, as amostras virais foram diluídas (MOI 1) em meio DMEM e inoculadas em placas de 6 poços contendo as monocamadas de células T98G, em diferentes tempos de infecção (24, 48 e 72 horas). O sobrenadante foi descartado, a monocamada fixada com paraformaldeído 4% e a membrana celular permeabilizada com solução de TritonX a 0,2% preparada em PBS contendo BSA a 3%. Posteriormente, realizou-se o bloqueio de sítios inespecíficos com solução de SFB a 2% preparada em PBS contendo BSA a 3%. A marcação da infecção nas células propostas para este estudo foi realizada utilizando-se anticorpo primário anti-flav 4G2 (D1-4G2-4-15|ATCC HB-112) cedido gentilmente pela Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa (Departamento de Morfologia/ICB/UFMG), diluída a 1:50 em em PBS contendo BSA a 3% e anticorpo secundário Anti-mouse IgG TRITC (SIGMA) diluído a 1:500 em PBS contendo BSA a 3%. O núcleo celular foi corado com reagente DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), um marcador fluorescente de ligação à regiões de DNA ricas em adenina-timina.

A leitura feita em microscópio de fluorescência *EVOS M5000 Cell Imaging System* (microscopia de fluorescência) ou em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (microscopia confocal de fluorescência).

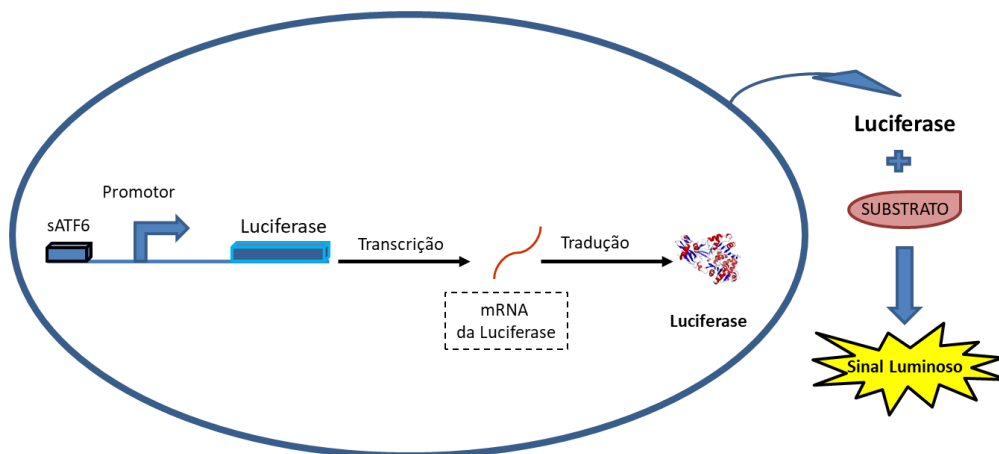
## **5.2 ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO ATF6 DA VIA UPR**

### **5.2.1 Ensaio da atividade transcricional de ATF6 em células T98G infectadas por ZIKV**

A ativação do braço ATF6 da via de estresse do RE foi avaliada utilizando o plasmídeo p5x-ATF6-GL3 em ensaios de gene repórter (WANG *et al.*, 2000). Esse plasmídeo

contém cinco cópias de sítios de ligação do ATF6 clonado no plasmídeo pOFlucGL3, cedido gentilmente pelo Dr. Dr. Kazutoshi Mori Kyoto University, Kyoto, Japão.

A quantificação de proteínas por métodos enzimáticos fornece uma estimativa indireta da atividade transcricional do vetor "repórter" que sintetiza a proteína. O gene repórter, neste caso, o gene que codifica a luciferase, está sob o controle de um promotor do gene de interesse, do fator de transcrição 6 (ATF6). A atividade da enzima pode ser detectada com a utilização de substratos da enzima luciferase capazes de atravessar a membrana plasmática (Figura 12). Estes sistemas têm sido usados como indicador sensível para avaliar a transcrição gênica. Uma vez que ATF6 esteja com sua atividade transcricional ativada ele se ligará ao sítio de transcrição presente no vetor e a transcrição da luciferase será disparada (WANG *et al.*, 2000). Os resultados são normalizados com a co-transfecção com vetor que contém o gene da proteína repórter *Renilla* luciferase, que é usado como controle da eficiência da transfecção (pRL-TK) para posterior determinação da atividade da luciferase e normalização dos resultados.



**Figura 12: Representação esquemática do ensaio do gene repórter da luciferase.**

O ensaio do gene repórter da luciferase envolve a colocação de um elemento regulador genético a montante de um gene da luciferase, no caso o sítio de ligação de ATF6, e a expressão desta enzima será diretamente correlacionada com a atividade deste elemento reguladore. Uma vez que houver atividade transcricional de ATF6, a luciferase será produzida e na presença de seu substrato, a emissão de luz será medida em luminômetro. Fonte: adaptado de GENTZ, 2011.

Neste ensaio, células T98G foram transfectadas com os plasmídeos p5xATF6-GL3 e pRL-TK - que expressa a luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do *Herpes virus simplex* tipo 1 (Quadro 1). Para inserção dos plasmídeos dentro da célula foi utilizado o reagente de transfecção Lipofectamine. Os complexos de DNA (200 ng de p5xATF6-GL3 e 50 ng de pRL-TK) e Lipofectamine 2000 (Invitrogen)) foram preparados em meio OPTIMEM (Invitrogen) e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados às células e incubados por 5 horas em estufa a 37 °C / 5% CO<sub>2</sub>. Ao término deste período, o sobrenadante foi descartado e adicionado DMEM 2,5% de SFB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C / 5% CO<sub>2</sub>, as células foram infectadas com ZIKV em diferentes MOI e intervalos de tempo. Os extratos celulares obtidos ao final foram utilizados para a análise da atividade da luciferase.

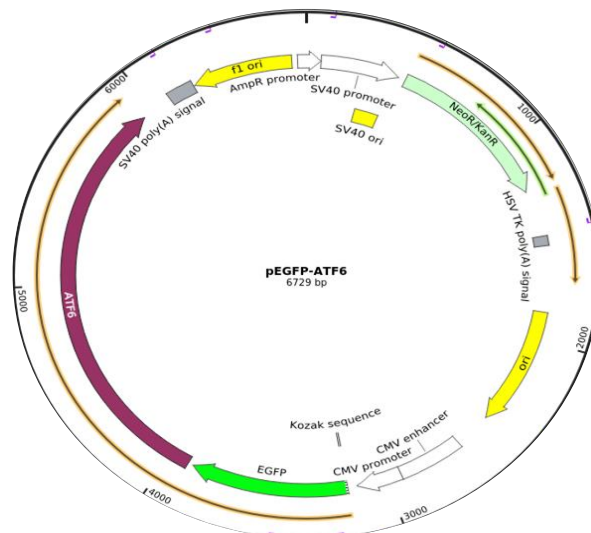
O ensaio de luciferase foi realizado utilizando-se o *kit Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay System* (Promega) conforme instruções do fabricante: 20 µL de cada amostra de extrato celular obtido foi adicionado a cada poço de uma placa de noventa e seis poços (FluoroNunc™), seguido da adição de 40 µL do substrato luciferina de *Photinus pyralis* (reagente LAR II do kit DLR) e a leitura realizada por 3 segundos para cada amostra. A normalização dos resultados foi feita com a leitura da luciferase da *Renilla reniformis* e 40 µl do reagente Stop & Glo (Promega) por poço. A leitura das amostras foi realizada em luminômetro (Lumicount Packard BioSciences) pelo programa Reader (Packard BioSciences). O ensaio foi comparado com amostras de células T98G sob estresse induzido por tunicamicina, como marcador da funcionalidade do teste e com células T98G não infectadas (mock), como controle negativo.

## **5.2.2 Detecção da translocação de ATF6-GFP em células T98G infectadas por ZIKV**

### **5.2.2.1 Microscopia de Fluorescência**

Para avaliar a translocação de ATF6 para o núcleo, células T98G foram transfectadas com plasmídeo (Figura 13) expressando ATF6 fusionada a proteína fluorescente verde

(Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP | ~30 KDa) e posteriormente, infectadas com ZIKV. Este método é descrito para avaliação do sensor ATF6, uma vez que este sensor durante o estresse celular é transportado do RE para o complexo de Golgi, onde é processado por proteases S1P e S2P e em seguida translocado para o núcleo onde ativa a transcrição de seus genes-alvo (CHEN *et al.* 2002; NADANAKA, *et al.* 2004)



**Figura 13: Mapa completo da sequência Addgene para pEGFP-ATF6.**

O plasmídeo ATF6-EGFP codifica uma proteína de fluorescência verde (EGFP, 30Kda) fusionada à porção N-terminal de ATF6 (90Kda). A transcrição de ATF6-EGFP é ativada pela presença de um promotor do citomegalovírus (CMV) que induz a expressão constitutiva de ATF-EGFP. Fonte: Adaptado de <https://www.addgene.org/32955/>

A adição de uma proteína de fusão EGFP (CORMACK *et al.*, 1996) permite monitorar o deslocamento por microscopia de fluorescência de ATF6 do RE para o núcleo em resposta ao estresse de RE. Uma limitação deste método pode ocorrer em caso de superexpressão da proteína, fato que poderia alterar a localização subcelular e a cinética do tráfego de proteínas. No entanto, a adição de parte de um promotor de Citomegalovírus (CMV) confere menor atividade e o ATF6-EGFP é menos expresso e assim, a proteína ATF6 fusionada a EGFP permanece localizada exclusivamente no RE e transloca-se para o núcleo de forma semelhante ao ATF6 endógeno (NADANAKA, *et al.* 2004), por esta razão selecionamos o plasmídeo pCMVshort-ATF6-EGFP (cedido gentilmente pelo Doutor Kazutoshi Mori), que contém a promotor reduzido de CMV, para este estudo.

Alguns estudos prévios avaliaram a eficiência deste sistema de avaliação do sensor ATF6, utilizando transfecção em modelos celulares distintos e indução de estresse celular por agentes químicos, como tunicamicina e DTT, e demonstraram a vantagem da utilização da EGFP, uma vez que esta proteína possui fluorescência intrínseca e permite que a translocação de ATF6 seja registrada em células vivas (NADANAKA, *et al.* 2004; SAMALI *et al.*, 2010).

Para realização do ensaio, monocamadas de T98G em placas de 12 poços foram transfectadas com a solução contendo os complexos de DNA/lipofectamina. A proporção de plasmídeo/lipofectamine/quantidade de células por poço foi previamente padronizada, para que se obtivesse a máxima eficiência de transfecção e em quantidade de células que possibilitasse visualização de isoladas, que se mantivessem viáveis. Foram avaliadas diferentes quantidades de plasmídeos (0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2µg), do reagente de transfecção – lipofectamine (1, 2 e 5µL) e de células por poço (12.500, 25.000, 50.000 e 100.000). Uma vez padronizadas as melhores condições, as células T98G (50.000 células/poço) foram transfectadas com 1 µg de plasmídeo de expressão pEGFP-ATF6short em 5 µL reagente de transfecção lipofectamine e meio Opti-MEM.

Após um período de incubação de 30 minutos, o volume foi completado para 1 mL com Opti-MEM e as monocamadas cobertas pela solução com os complexos de lipofectamina e incubadas a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>, por 5 horas em estufa. Ao término deste período, o sobrenadante foi descartado e adicionado DMEM 2,5% de SFB. Após 24 horas nestas condições, as células foram infectadas com *Zika virus* (ZIKV AF ou ZIKV AS), com MOI igual a 1.

Após 72 hpi, foi feita marcação do vírus Zika, com anticorpos específicos para identificação de *Flavivirus* e para marcação do núcleo (DAPI), conforme descrito no item 5.1.5. Assim, a translocação de ATF6 para o núcleo foi visualizada por microscopia de fluorescência nas células infectadas com o ZIKV, não infectadas (mock) ou com estresse induzido por tunicamicina. Os registros foram feitos em microscópio de fluorescência EVOS M5000 Cell Imaging System. Alternativamente foi utilizado o sistema Nikon Center of Excellence (Nikon CoFE), como descrito abaixo.

### 5.2.2.2 Microscopia Confocal de Fluorescência

Ainda para a visualização da ocorrência da translocação de ATF6-EGFP, foram feitas análises por microscopia confocal de fluorescência. As imagens foram feitas no laboratório Laboratório de Imunobiofotônica/ICB/UFMG - Nikon Center of Excellence (Nikon CoFE) gerenciado pelo Prof. Gustavo Menezes.

Células T98G foram cultivadas em placas de 12 poços contendo lamínulas de vidro pré-tratadas em ácido-álcool (HCL 1M e Álcool 70%) alocadas na base da placa. As células T98G (50.000 células/poço) foram cultivadas por 24 horas para adesão e estabelecimento da monocamada celular e após este período foram transfectadas conforme protocolo descrito anteriormente (item 5.2.2.1).

Após 72 hpi, foi feita marcação do vírus Zika, com anticorpos específicos para identificação de *Flavivirus* e para marcação do núcleo (DAPI), conforme descrito no item 5.1.5. Assim, a translocação de ATF6 para o núcleo foi visualizada por microscopia confocal de fluorescência nas células infectadas com o ZIKV, não infectadas (mock) ou com estresse induzido por tunicamicina.

Para a eliminação da autofluorescência, os parâmetros de definição de luminosidade de cada laser foram normalizados utilizando-se um controle de células não transfectadas e um controle de células marcadas apenas com anticorpo secundário.

A proteína EGFP foi visualizada utilizando o canal para FITC, e as proteínas do envelope viral foram identificadas no canal de TRITC e o núcleo em DAPI. As imagens foram feitas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti, em aumento de 40x. As imagens para registro da localização das marcações e reconstrução 3D e vídeos foram feitas utilizando os programas *ImageJ Fiji* (SCHINDELIN *et al.*, 2012) e *Icy bioimageanalysis* (Institut Pasteur/France-BioImaging), respectivamente.

### 5.3 ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO IRE1/XBP1 DA VIA UPR

A fim de avaliar a possível ativação do braço IRE1 da via UPR por *ZIKV*, foi investigado o processamento do fator de transcrição XBP1 nas células T98G após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de infecção com *ZIKV AS* ou *ZIKV AF*, utilizando-se os iniciadores específicos para detecção de XBP1 total (formas processada e não processada), denominados hXBP1total F e hXBP1total R (Tabela 1), em ensaios de PCR convencional seguidos por restrição enzimática pela técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) e por ensaios de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

Os iniciadores para amplificação específica da forma processada de XBP1 foram projetados por *Schadewijk e colaboradores (2012)* de forma a se ligar na região processada do mRNA após a retirada do intron de 26 pb do mRNA de XBP1.

Para avaliação da expressão gênica de XBP1 processada e não processada pelas técnicas supracitadas, células T98G foram plaqueadas em placas de 6 poços e infectadas com *ZIKV AS* ou *ZIKV AF* (MOI 1), incubadas a 37 °C / 5% de CO<sub>2</sub> por períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, nos quais foram realizadas as coletas das células.

O RNA total foi extraído das células utilizando TRI Reagent (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi ressuspenso em água livre de nucleases e a concentração do RNA total estimada por espectrofotometria, através da leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). O grau de pureza do RNA foi avaliado com base na razão entre as leituras de 260 e 280nm, sendo que foram considerados valores superiores a 1,8, o que sugere que o RNA está puro e passível de ser usado experimentalmente.

Para confirmação da integridade dos RNA extraídos, as amostras foram resolvidas em gel desnaturante (1% de agarose) contendo brometo de etídio como corante e visualizadas no sistema de transluminação UV. Após a extração e a verificação dos RNAs, 1µg de RNA total de cada amostra foi utilizado na produção de cDNAs.

Os cDNAs foram sintetizados por reação em cadeia da polimerase (PCR), na presença de oligo-dT15, dNTPs e enzima transcriptase reversa MMLV e oligo-dT (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação é realizada a 42°C por 60 minutos, seguida de inativação da enzima MMLV-RT a 65°C por 15 minutos. As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C.

### 5.3.1 Análise do processamento de XBP1 por RFLP

Para definir os eventos de sinalização da via IRE1, em estresse do RE desencadeados por ZIKV, foi analisada a atividade de ribonuclease de IRE1 pelo processamento de seu substrato (mRNA de XBP1).

IRE1 é uma endonuclease que cliva um intron residual de 26 nucleotídeos presente no mRNA do fator de transcrição XBP1 (CALFON *et al.*, 2002). Para avaliar se ocorre o processamento de XBP1, o RNA total obtido das células e transcrito ao cDNA foi utilizado para a amplificação por RT-PCR do mRNA do fator de transcrição XBP1 com os iniciadores específicos para XBP1 total, aqui denominados hXBP1total F e hXBP1total R (Tabela 1) nas seguintes condições: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 68°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Finalmente, um terço do volume da reação de RT-PCR foi submetido à digestão enzimática com PstI a 37°C por 3 horas. No intron processado de 26 nucleotídeos do mRNA de XBP1 existe um sítio de restrição para a enzima PstI. Portanto, a amplificação por PCR de segmentos do mRNA de XBP1 a partir de células que sofrem estresse do RE, não conterão esta sequência, o que permite diferenciar o mRNA de XBP1 processado do não processado, após a digestão enzimática do produto de PCR com PstI e fracionamento em gel de agarose. Como controles positivos da indução do processamento do mRNA de XBP1, foi utilizado Tunicamicina, um agente que induz estresse no RE.

Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio (Life Technologies) e registrados em sistema de imagens UVP MultiDoc-It. As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012) e o

percentual da forma processada de XBP1 (XBP1s) foi calculado a partir do total, que é definido pela soma das quantidades de isoformas.

### 5.3.2 Análise do processamento de XBP1 por PCR quantitativo

A verificação da presença do processamento de XBP1 na presença da infecção por ZIKV, também foi avaliada por RT-PCR quantitativo em tempo real. Para este fim, o cDNA produzido, conforme descrito no item 5.3, foi utilizado para determinar os níveis de mRNA de XBP1 processado (XBP1s), utilizando-se iniciadores específicos da forma processada de XBP1, aqui denominados hXBP1 spl F e hXBP1 spl R (Tabela 1) e SYBR®Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems®, Foster City, CA). Além disto, a presença do vírus foi confirmada pela amplificação do RNA viral por iniciadores específicos de ZIKV, aqui denominados ZIKV F e ZIKV R (Tabela 1). As reações seguiram as especificações do fabricante e a análise procedida em instrumento *StepOne* (AppliedBiosystem®).

A detecção do produto de amplificação realizada por SYBR Green (Applied Biosystems®) fornece a quantificação do produto da reação através da emissão de fluorescência verde após a ligação do reagente entre a dupla fita de DNA.

Para cada par de iniciadores foi realizado o cálculo da eficiência pela determinação da curva padrão. A análise do padrão de expressão de cada gene foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e normalizadas pela expressão de mRNA de genes constitutivos, onde a quantidade de cDNA é estimada em relação a expressão de genes constitutivos. Os genes estudados neste trabalho tiveram seus valores de Ct (*Threshold Cycle* – número de ciclos) normalizados com os resultados de expressão obtidos para os genes HPRT,  $\beta$ -Actina, GAPDH e 18SRNA previamente descritos na literatura em ensaios com T98G (HAGA *et al.*, 2003; VALENTE *et al.*, 2009).

As réplicas intra-experimentais foram feitas em triplicata e as réplicas biológicas em duplicata. Os resultados da amplificação foram processados pelo *StepOne Software v2.3* do equipamento (7500 Real Time PCR System – Applied Biosystems®) e, posteriormente, analisados conforme o método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

#### **5.4 ANÁLISE DO EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO PERK DA VIA UPR em ensaio de RT-qPCR**

A fim de avaliar a possível alteração na expressão de genes responsivos ao estresse do RE disparada por PERK, em células infectadas por *ZIKV*, investigamos os níveis de expressão de genes dependentes de PERK em diferentes intervalos após infecção com *ZIKV AF* ou *ZIKV AS*.

A partir do produto da síntese de cDNA, foi realizada a análise de quantificação do mRNA de genes da via PERK: ATF4, CHOP aqui denominados hATF4 F/hATF4 R; hchopf/hCHOPR, respectivamente (Tabela 1). A quantificação da expressão dos genes codificadores das proteínas ATF4 e CHOP é importante para avaliação da infecção sobre o braço PERK da via UPR. Os procedimentos das técnicas utilizadas para obtenção do cDNA e qPCR foram descritos nos itens 5.3 e 5.3.2.

Além destes, a presença do vírus foi confirmada pela amplificação do RNA viral por iniciadores específicos de *ZIKV*. A quantificação do número de cópias do vírus em células infectadas foi feita pela extrapolação a partir de curva padrão, que foi construída, a partir de quantidades conhecidas de RNA. O experimento foi conduzido em colaboração com Dr. Thiago Lima Leão, no laboratório de desenvolvimento desta tese.

Para isto, o vírus foi amplificado em C636 (item 5.1.1) e o sobrenadante da cultura, contendo as partículas virais, foi purificado por ultracentrifugação (100.000xg) em Tris-NaCl-Edta e Glicerol. Posteriormente, o RNA total extraído (kit qiaAmp viral) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) foi utilizado para fazer a curva padrão através da realização de diluições seriadas e amplificação em ensaio de RT-qPCR com os iniciadores específicos para *ZIKV*.

A curva padrão permitiu a conversão do CT das amostras analisadas em número de cópias de Zika/mL. Utilizamos a seguinte fórmula para vincular essa quantificação à quantidade de RNA para a análise de cada amostra:

$$\frac{\text{Xg} / \mu\text{L RNA}}{\text{Tamanho do transcrito} \times 320} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde o tamanho do transcrito é o tamanho do genoma viral em pb (10.794 pb); 320 g/mol corresponde ao peso molecular médio de 1 base de ssRNA e  $6,022 \times 10^{23}$  é o número de moléculas em 1 mol (número de Avogrado).

Os valores de CT correspondentes às dosagens permitem a extrapolação para quantificação das amostras de ZIKV nos experimentos com as células de neuroblastoma. A confirmação da presença do RNA viral em todos os experimentos realizados pelo método de RT-qPCR foi monitorada conforme descrito neste ítem, pela detecção com iniciadores específicos para ZIKV e extrapolação em curva padrão.

## **5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CHAPERONAS EM CÉLULAS INFECTADAS POR ZIKV**

Para avaliar a indução de chaperonas importantes na via UPR foram avaliadas a produção de mRNA por qPCR, utilizando-se iniciadores específicos de BiP/GRP78; e a expressão proteica por citometria de fluxo, para detecção das chaperonas BiP/GRP78 e Calregulina através de ensaios de Imunomarcagem com anticorpos específicos para GRP78 (Santa cruz - sc-376768) e Calregulin (Santa cruz - sc-373863). Além disto, para controle da infecção foi utilizada marcação com anticorpos anti-flavivírus (Santa cruz - sc-58128).

### **5.5.1 Análises da produção gênica de BiP/GRP78 por qPCR**

A partir do produto da síntese de cDNA, foi realizada a análise de quantificação do mRNA de BiP/GRP78, com os iniciadores aqui denominados hBIPF/ hBIPR (Tabela 1). A avaliação da expressão de BiP é importante para avaliação da infecção sobre o dobramento de proteínas pela ativação da via UPR. Os procedimentos das técnicas

utilizadas para obtenção do cDNA e qPCR foram descritos nos itens 5.3 e 5.3.2, respectivamente.

#### **5.5.2 Análises da expressão das proteínas BiP/GRP78 e Calregulina por citometria de fluxo**

A expressão das chaperonas BiP/GRP78 e Calregulina foi avaliada em citometria de fluxo através da imunomarcacão com anticorpos específicos para estas proteínas e co-marcacão com anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo TRITC.

Para isto, células T98G foram infectadas com os vírus *ZIKV AS* ou *ZIKV AF* por 48 e 72 horas (MOI 1). Como controle de estresse celular foi utilizado o indutor de estresse celular Tunicamicina. Após a infecção as células foram descoladas com tripsina/EDTA e solubilizadas em meio DMEM contendo 2.5% de SFB. Em seguida, foram centrifugadas por 5 min a 1.500 RPM e 4°C e o sedimento solubilizado em 1 mL de meio DMEM contendo 2.5% de SFB. Foi procedida a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para  $4 \times 10^6$  células/mL. Assim, distribuiu-se 100 µL de células em cada poço de uma placa de 96 poços. Previamente as células foram centrifugadas (2.100 RPM por 3 minutos a 4°C), o sobrenadante descartado e o sedimento de células permeabilizadas, em tampão contendo Triton-X (Sigma). Então, a marcação dos antígenos de interesse foi realizada por marcação intracelular indireta em dois passos. Na primeira etapa adicionou-se anticorpos para a marcação das chaperonas anti-GRP78 (Santa Cruz Biotechnology – sc-376768) ou anti-Calregulin (Santa Cruz Biotechnology – sc-373863) ou para detecção da proteína do envelope viral do *ZIKV*, o anticorpo primário monoclonal 4G2 anti-Flavivirus (Santa Cruz Biotechnology – sc-58128) diluídos a 1:50 e incubou-se a placa 37°C por 30 minutos.

Após este período a placa foi centrifugada a 2.100 RPM por 3 minutos a 4°C e, numa segunda etapa, o sedimento foi solubilizado em 50 µL do anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado ao fluorocromo TRITC (Sigma) diluído 1:100 e incubou-se a 37°C por 30 minutos, ao abrigo da luz. As células mortas foram excluídas da análise através da utilização do marcador de viabilidade 7AAD (7-Aminoactinomicina D).

Após a incubação, a placa foi centrifugada 2.100 RPM por 3 minutos a 4°C, o sedimento celular foi solubilizado em solução salina PBS e transferidos para tubos de citometria. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto (BD Biosciences).

A análise dos dados foi feita em programa de computador específico multiplataformas *FlowJo* (FlowJo, LLC). Este programa permite a criação de regiões, denominadas *gates*, que identificam as populações celulares de interesse, com o intuito de avaliar a intensidade da fluorescência emitida pelos fluorocromos utilizados para marcações das populações e dos alvos de interesse. Assim, foi possível determinar o percentual de células em cada *gate* e a fluorescência das marcações das proteínas pesquisadas (Proteínas do Envelope viral/*Flavivirus*, BiP/GRP78 e Calregulina). Foram utilizadas duas marcações com leituras nos canais correspondentes ao PE, para leitura de TRITC (Tetrametilrodamina) utilizado para marcação das proteínas alvo do estudo e PE-Cy5, para leitura do 7-AAD para identificação das células viáveis. Inicialmente foi realizada a identificação da população a ser estudada quanto às propriedades físicas, isto é, quanto ao tamanho (FSC – *forward scatter*) e a granulosidade (SSC – *side scatter*) por gráfico *dot plot*, selecionando para o eixo x e y esses parâmetros morfológicos.

Uma segunda *gate* foi construída de forma a eliminar possíveis “*doublets*” e seleção de “*singlet cells*”, para eliminar a contagem de células agregadas, que ao passar na frente do laser são caracterizadas como um único evento. Para isto, utilizou-se gráfico baseado na seleção foi feita com base no tamanho e na largura das partículas (FSC-H x FSC-A). Uma terceira *gate* foi selecionada para eleger as células viáveis, ou seja, as células não marcadas pelo 7AAD (SSC x PE-Cy5). Finalmente foi feita a avaliação da intensidade de fluorescência do fluorocromo utilizados no protocolo de marcação da amostra. Os resultados foram expressos pela determinação da Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) e os gráficos e desvios calculados de duplicatas, plotados utilizando ferramentas do programa de construção de gráficos *GraphPad Prism* 8.0.1.

## 5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DA VIA UPR: MATRIZ DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QUANTITATIVE REAL TIME-PCR ARRAY)

Com intuito de avaliar amplamente a transcrição de genes envolvidos na UPR em infecções pelo *ZIKV* elegeram-se o ensaio de matriz de qPCR (*qPCR array*) para detecção de 84 genes da resposta de estresse celular presentes em células humanas. Selecionamos o ensaio de PCR em tempo real para medir a expressão gênica, pela quantificação relativa através da análise das alterações na expressão gênica das amostras de células infectadas em relação a amostra de referência, ou seja, a célula não infectada, traçamos o perfil de expressão de genes da via UPR, no qual determinamos a abundância relativa do transcrito para determinar os padrões de regulação dos genes entre amostras.

Neste ensaio, optamos por utilizar apenas a amostra asiática já que cronologicamente este foi um ensaio realizado já no final do projeto, e em função do contingenciamento de reações e também por entendermos que a análise do *ZIKV AS* é prioritária em relação ao *ZIKV AF* uma vez que a primeira, responsável pela epidemia recente, é a amostra de circulação que está associada ao desenvolvimento de quadros neurológicos graves da SCVZ.

Para este ensaio realizou-se infecção de células T98G com a amostra *ZIKV AS*, seguida de coleta das células, extração do RNA total e síntese do cDNA, conforme descrito anteriormente. O RNA foi quantificado por um espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) e a qualidade das amostras também foi avaliada visualizando as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S separadas por agarose a 1% com coloração com brometo de etídio.

Para o preparo das reações de qRT-PCR Array foi utilizado kit *RT2 Profiler™ PCR Array Human Cellular Stress Responses* (Qiagen). Inicialmente as amostras foram validadas pelo padrão de qualidade pelo kit *RT2 Profiler QC Array* (Qiagen).

Para ensaio de Matriz foram utilizadas as condições especificadas pelo fabricante: 1350 µl do master mix (*RT2 SYBR® Green qPCR Mastermixes*- Qiagen) adicionado de 102 µl de cDNA diluído com volume final de 2500 µl e distribuído 25 µl em cada poço da cada placa de 96 poços contendo iniciadores específicos para cada gene associado a via UPR.

A reação da qRT-PCR foi processada pela máquina da ABI – 7300 Real Time PCR System – USA (localizada na Fundação Hemominas, aos cuidados da Profa. Dra. Marina Martins). O ciclo da PCR consistiu em um primeiro estágio de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido do segundo estágio de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, um minuto a 60 °C para o anelamento e um ciclo para a curva de dissociação de 95 °C por 15 segundos e terceiro estágio de 60 °C por 30 segundos e 95 °C por 15 segundos. Por fim, as análises de cada reação da qRT-PCR foram realizadas pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001), que representa o número de vezes que o gene de interesse está mais ou menos expresso em células infectadas com *ZIKV* quando comparado com às células não infectadas. Para a normalização dos dados foram utilizados 4 genes de expressão constitutiva (*Actb*, *GAPDH*, *HPRT1*, e *RPLP0*).

O Fold change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) foi calculado dividindo-se os valores da expressão gênica normalizada ( $2^{-\Delta C_t}$ ) das amostras de Teste pela expressão gênica normalizada ( $2^{-\Delta C_t}$ ) das Amostras de controle.

As análises foram feitas em programa computacional disponibilizado pelo fabricante (<https://dataanalysis.qiagen.com/pcr/arrayanalysis>). Os dados foram expostos em *Fold Regulation* que representa os resultados da mudança de *fold* de uma maneira biologicamente significativa, sendo que os valores de *Fold change* maiores que 1 indicam uma regulação positiva ou uma regulação de subida e o *Fold Regulation* é igual ao *Fold change*. Para valores menores que 1, que indicam uma regulação negativa, *Fold Regulation* é o inverso negativo do *Fold change*. Neste caso, a análise considera alterações significativas para valores maiores que 2 ou menores que -2. Portanto, os genes dos grupos 24, 48 e 72hpi que tiveram alterações de dobra de mais de 2 na expressão contra grupos de controle negativo foram considerados significativos. Para plotagem dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0.1.

## **V Resultados e discussão**

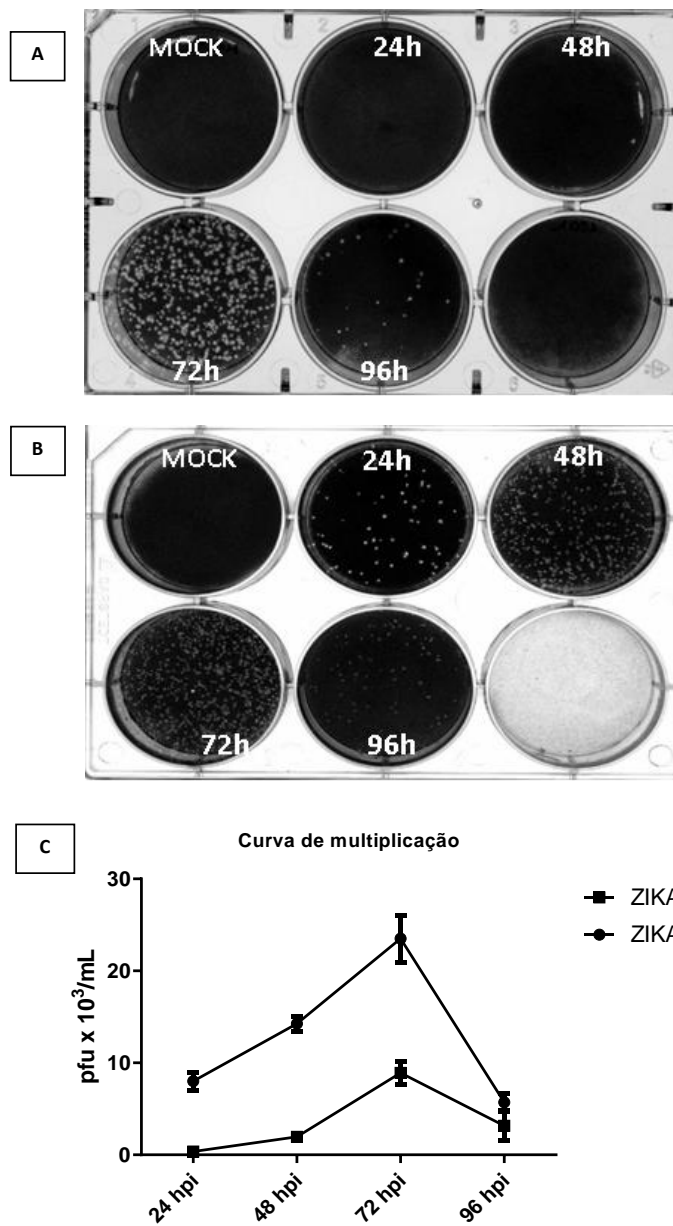
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DO VIRUS ZIKA EM CÉLULAS T98G

#### 6.1.1 Detecção da infecção de células T98G por curva de multiplicação

Para a verificação do estresse do RE e o controle da via UPR *in vitro*, inicialmente testamos o modelo celular de neuroblastoma, células T98G, e demonstramos que as células foram permissivas à entrada do vírus e que a replicação do ZIKV, da amostra asiática e da amostra africana, foi eficiente. Usando este modelo celular, investigamos se, durante o ciclo de replicação com a utilização da maquinaria do RE para a produção das proteínas virais e a alta sobrecarga proteica a ser processada, ocorre a ativação da via UPR e, ainda, se há regulação dos três ramos da via UPR por estas amostras. A infecção celular e a produção viral em células T98G foram comprovadas por ensaios de curva de multiplicação e imunofluorescência. Além destes ensaios, a presença do RNAm e da proteína do envelope de ZIKV foram avaliadas nos ensaios de RT- qPCR e Citometria de fluxo e em conjunto comprovam a eficiência da infecção do modelo selecionado para este estudo.

Para a confecção da curva de multiplicação (Figura 14), os sobrenadantes de células infectadas foram coletados em 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a infecção e titulados. O ensaio de titulação e visualização de placas em células Vero indicou que o modelo celular utilizado é permissivo aos vírus, tanto para amostra asiática, quanto para a amostra africana. Além da permissividade das células T98G à infecção pelo *Zika vírus*, o ensaio de multiplicação revelou que existem diferenças entre as amostras na infecção das células T98G, em relação ao tempo e à quantidade de partículas produzidas. Para a amostra asiática (ZIKV AS) observa-se início da produção de partículas virais próximo à 48 horas após a infecção (Figura 14, painel A) enquanto para a amostra (ZIKV AF) é possível observar a produção de partículas virais em 24 horas após a infecção (Figura 14, painel B). Nota-se também que apesar de o pico máximo de replicação para ambas as amostras ser próximo a 72 horas após a infecção, a amostra africana produz maior quantidade de partículas, em mesmas condições de infecção, quando comparada à amostra asiática. O número de unidades formadoras de placas (pfu) em cada tempo de infecção (hpi) foi calculado e os dados plotados em  $\text{pfu} \times 10^3 / \text{mL}$  (Figura 14, painel C).

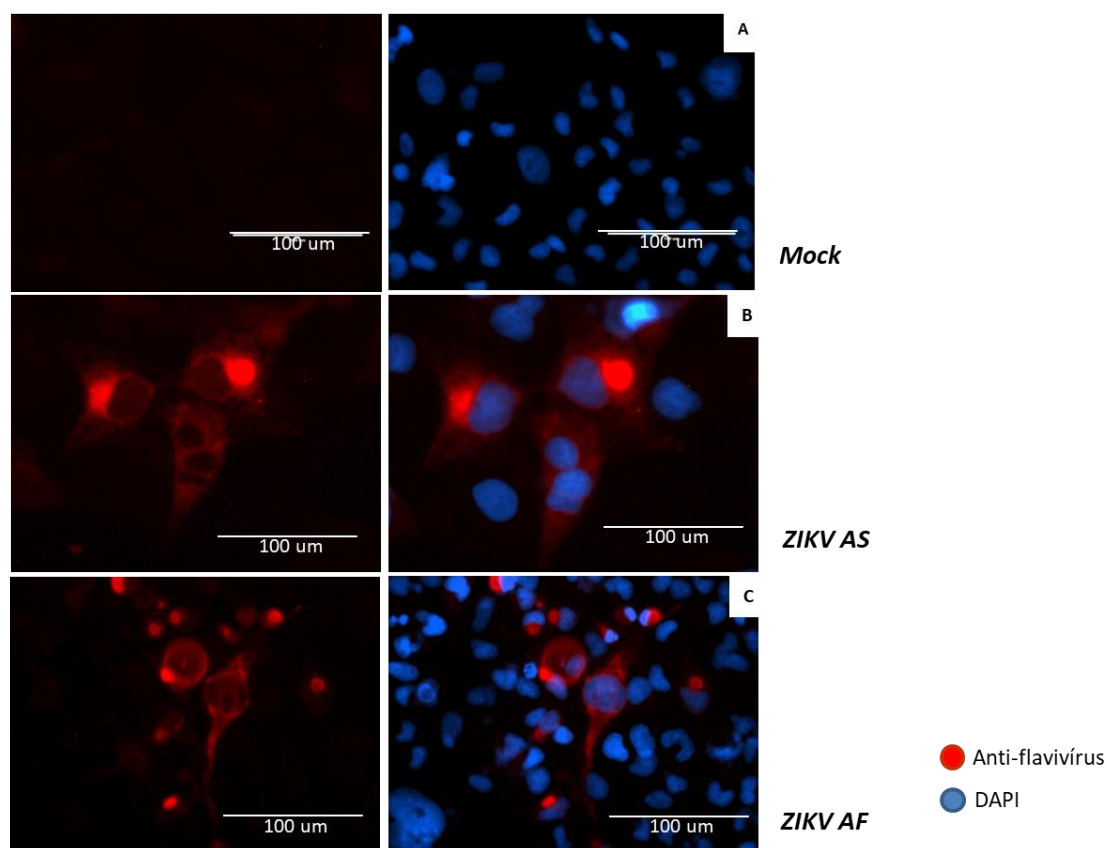


**Figura 14: Infecção de células T98G pelo ZIKV AS ou ZIKV AF em ensaio de curva de multiplicação.**

Ensaio de titulação viral em células Vero, feito por curva de multiplicação para as amostras de A) Zika vírus asiática (ZIKV AS) e B) Zika vírus africana (ZIKV AF). Em C) a representação gráfica da contagem de unidades formadoras de placas (PFU) para cada amostra viral nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas após infecção de células T98G. Os resultados da representação gráfica são apresentados como duplicatas de dois experimentos independentes.

### 6.1.2 Detecção da infecção de células T98G por ensaio de imunomarcacão com anticorpos *anti-flavivírus*

A imunomarcacão com anticorpos anti-favivirus foi realizada 48 horas após a infecção com MOI igual a 1. O ensaio de imunomarcacão com anticorpos específicos para *Flavivirus* e visualização em microscopia de imunofluorescência mostrou a presença do vírus, para ambas as amostras, ZIKV AS e ZIKV AF, nas células estudadas (Figura 15).



**Figura 15: Visualização da infecção das células T98G por ZIKV AS ou ZIKV AF em microscopia de fluorescência.**

A) T98G não infectadas ou (B) após 48 horas de infecção com ZIKV asiático ou (C) com ZIKV africano (MOI 1) em ensaio de imunofluorescência. A marcação da presença do vírus Zika foi feita com anticorpos anti-flavivirus 4G2 (em vermelho). O núcleo celular foi marcado em azul (DAPI). As imagens foram captadas em *EVOS M5000 Cell Imaging System*, em aumento de 40X.

Estudos prévios demonstraram a permissividade ao ZIKV de outras linhagens de células de neuroblastoma de camundongo e humano (ANFASA *et al.*, 2017; GLADWYN-NG *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2018), no entanto, o presente estudo mostra pela primeira vez a infecção em células de glioblastoma humano T98G com o Zika virus.

O ensaio da curva de multiplicação corrobora estudos que avaliaram as diferenças no fenótipo entre as duas amostras de ZIKV. Anfasa e colaboradores (2017) demonstraram que há diferenças entre os títulos virais produzidos bem como na intensidade da indução de morte celular. Neste estudo verificou-se que a amostra africana replicou com títulos mais elevados em células Vero, células de glioblastoma humano U87MG, células de neuroblastoma humano SK-N-SH e hNPCs, em relação à amostra asiática de ZIKV. Além disso, a infecção com amostra africana do ZIKV resultou em altas porcentagens de morte celular em hNPCs (ANFASA *et al.*, 2017, SHERIDAN *et al.*, 2018).

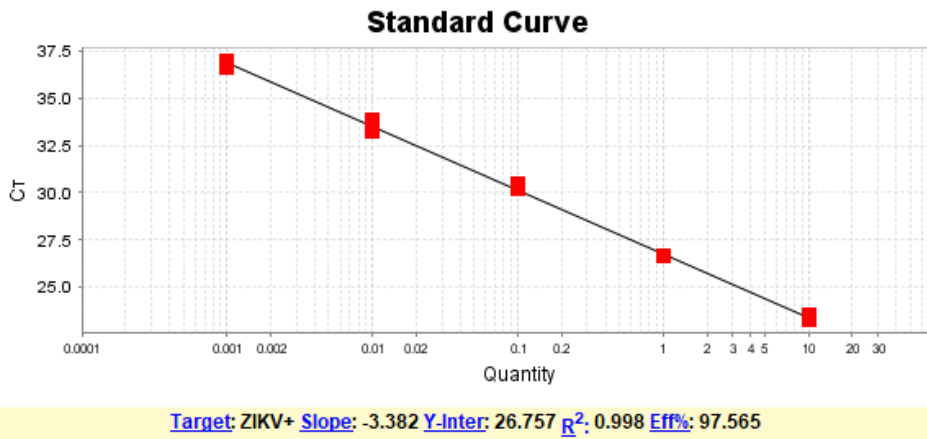
O presente estudo também verificou maior intensidade de morte celular na infecção das células T98G pela amostra africana quando comparada à amostra asiática, em mesmo tempo de infecção. Nota-se que em 120 horas após infecção não há presença de título viral detectável em placa para ZIKV AF, uma vez que houve completa destruição da monocamada celular no ensaio com T98G e, portanto, por limitar a produção da progênie viral, impossibilitou a coleta desta amostra neste período.

Em conjunto, os dados confirmam a que as células T98G são permissivas à penetração do vírus e, além disto, são infectadas, possibilitando a produção de partículas virais maduras.

### **6.1.3 Detecção da infecção de células T98G por ensaio de RT-qPCR**

Para detectar a presença do RNA viral nas células estudadas e confirmar a infecção por ZIKV em células T98G nos ensaios de PCR quantitativo de genes chaves da via UPR, foi realizado ensaio de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para ZIKV, a partir do RNA extraído das células infectadas, conforme protocolo descrito em nos itens 5.3 e 5.3.2.

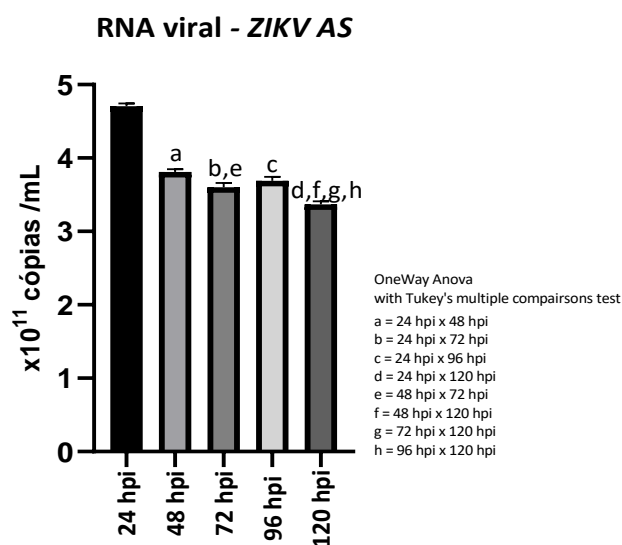
Os dados foram expressos em número de cópias por mL extrapolados de acordo com os valores da curva padrão construída (Figura 16).



**Figura 16: Curva de padronização para quantificação de RNA de ZIKV.**

A quantificação do número de cópias do ZIKV das células T98G infectadas foi feita pela extrapolação a partir de curva padrão, que foi construída, a partir de quantidades conhecidas do RNA de ZIKV obtidos por purificação em ultracentrifugação e glicerol. O RNA viral extraído e quantificado foi avaliado em RT-qPCR com iniciadores específicos para ZIKV. O gráfico representa os valores de CT correspondentes às dosagens de RNA viral em diluição seriada entre 0,001 e 10 ng.

Com a construção da curva de padronização foi possível extrapolar os valores de CT obtidos no ensaio de RT-qPCR nos experimentos com as células de neuroblastoma e obter a concentração do número de cópias de RNA em cada tempo após infecção. Os resultados demonstram a presença do RNA do *Zika vírus* nas células infectadas (Figura 17). O controle negativo para amplificação com iniciadores específicos do ZIKV em ensaio de RT-qPCR a partir do RNA total extraído de células não infectadas não mostrou amplificação, *ie.*, apresentou valores de CT maiores que 40 ou indeterminados.

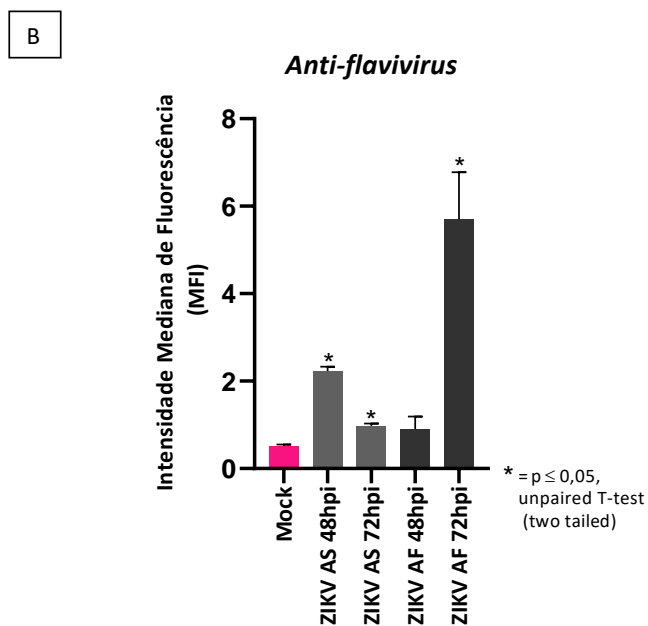
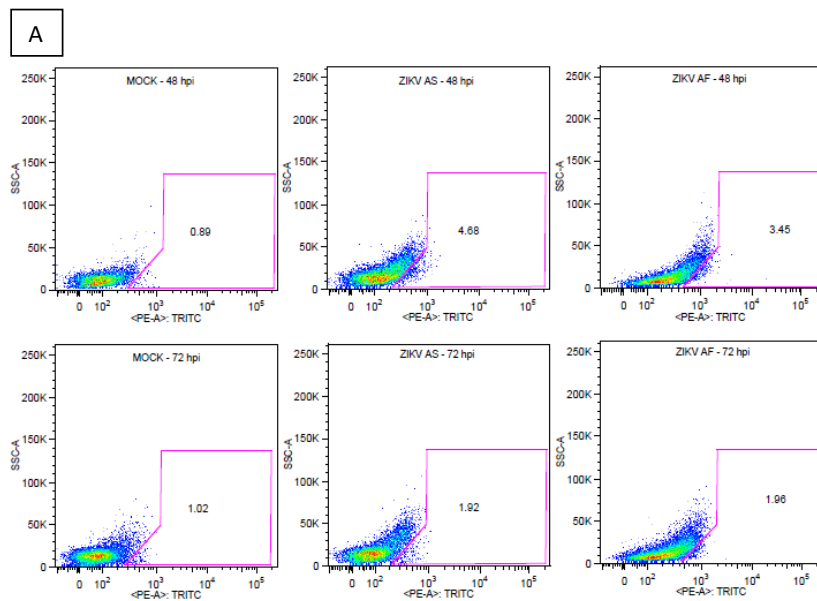


**Figura 17: Expressão do RNA mensageiro de ZIKV AS em células T98G infectadas.**

Células T98G infectadas pelo ZIKV AS foram submetidas à extração do RNA total e confecção do cDNA que foi analisado por RT-qPCR utilizando-se iniciadores específicos para *Zika virus* (Xu *et al.*, 2016). Os dados confirmam a presença do mensageiro do vírus *Zika* nas células infectadas em todos os tempos em horas após a infecção (hpi). Os dados são apresentados como a média de triplicatas de um único experimento.

#### 6.1.4 Detecção da infecção de células T98G no ensaio de Citometria de Fluxo

A presença do vírus nas células estudadas também foi detectada pela marcação das proteínas virais com anticorpo *anti-flavivirus*, que reconhecem especificamente à proteína do envelope do ZIKV. A detecção foi feita pelo ensaio de citometria de fluxo, conforme descrito no ítem 5.5.2 e mostrou a presença do vírus nas células infectadas. Os histogramas (Figura 18, painel A) mostram a *gate* selecionada para identificação da população de estudo, ou seja, as células marcadas com anti-flavivírus/TRITC, em células não infectadas (mock 48hpi e mock 72hpi) e em células infectadas (ZIKV AS e ZIKV AF em 48 e 72 hpi). Os resultados também foram apresentados em Intensidade média de fluorescência, e mostraram a presença da proteína do envelope viral em 48 hpi e 72 hpi, para ambas as amostras estudadas (Figura 18, painel B).



**Figura 18: Detecção do ZIKV pela marcação da proteína E do envelope viral.**

Células T98G infectadas pelo *ZIKV AS* ou *ZIKV AF* foram submetidas a imunomarcagem com *Anti-Flavivirus* (4G2), co-marcadas com TRITC e analisadas por ensaio de citometria de fluxo lateral. *Mock* corresponde às células não infectadas e apresentou baixa intensidade mediana de fluorescência (MFI). Em A estão representadas as gates selecionadas para análise da população de células marcadas pelo anticorpo anti-flavivirus, que identifica a proteína do envelope do ZIKV, e TRITC em para células não infectadas (*Mock*) ou infectadas com as amostras *ZIKV AS* e *ZIKV AF* em 48 e 72 hpi. B) As células infectadas mostram a presença da proteína E, mais elevada em 48 hpi para *ZIKV AS* e em 72 hpi para *ZIKV AF*. Os dados são apresentados como a média de duplicatas.

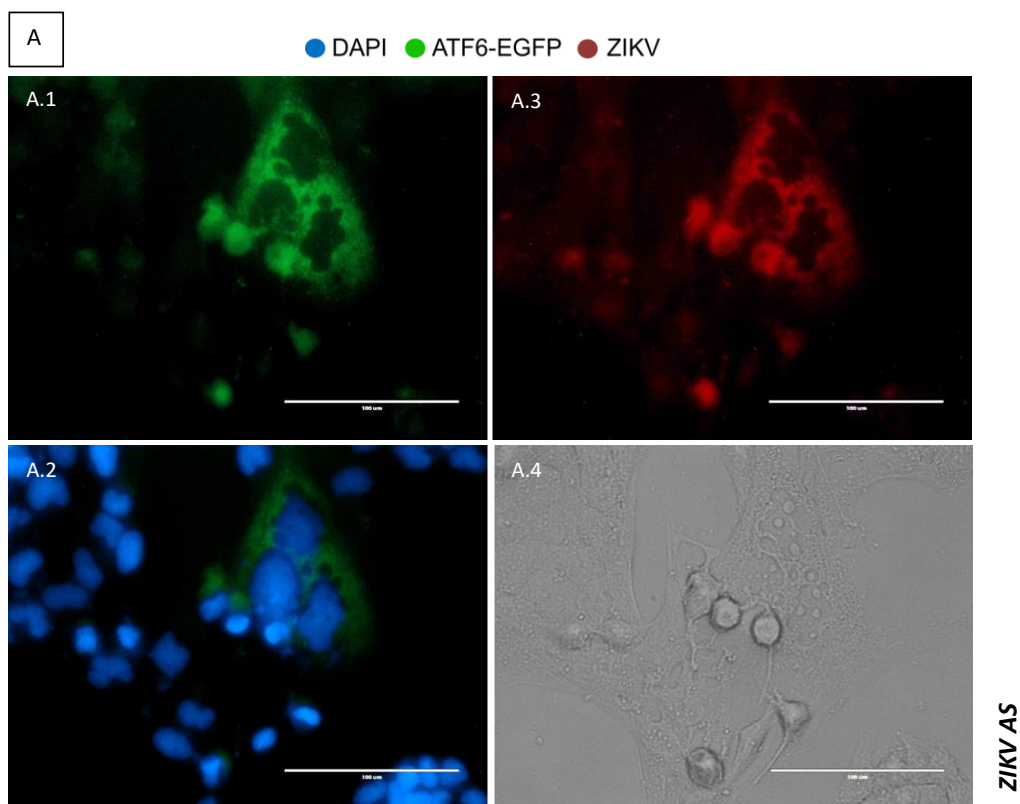
É importante destacar que o ensaio apresentado na figura 17 foi realizado a partir do RNA celular total extraído, e a detecção proteica apresentada na Figure 18 é correspondente à proteína E que encontra-se ainda dentro da célula, presente no RE ou nas partículas imaturas dentro do Complexo de Golgi e exossomos. Assim, os dados não correspondem necessariamente à produção das partículas virais maduras liberadas que estariam presentes no sobrenadante da cultura de células.

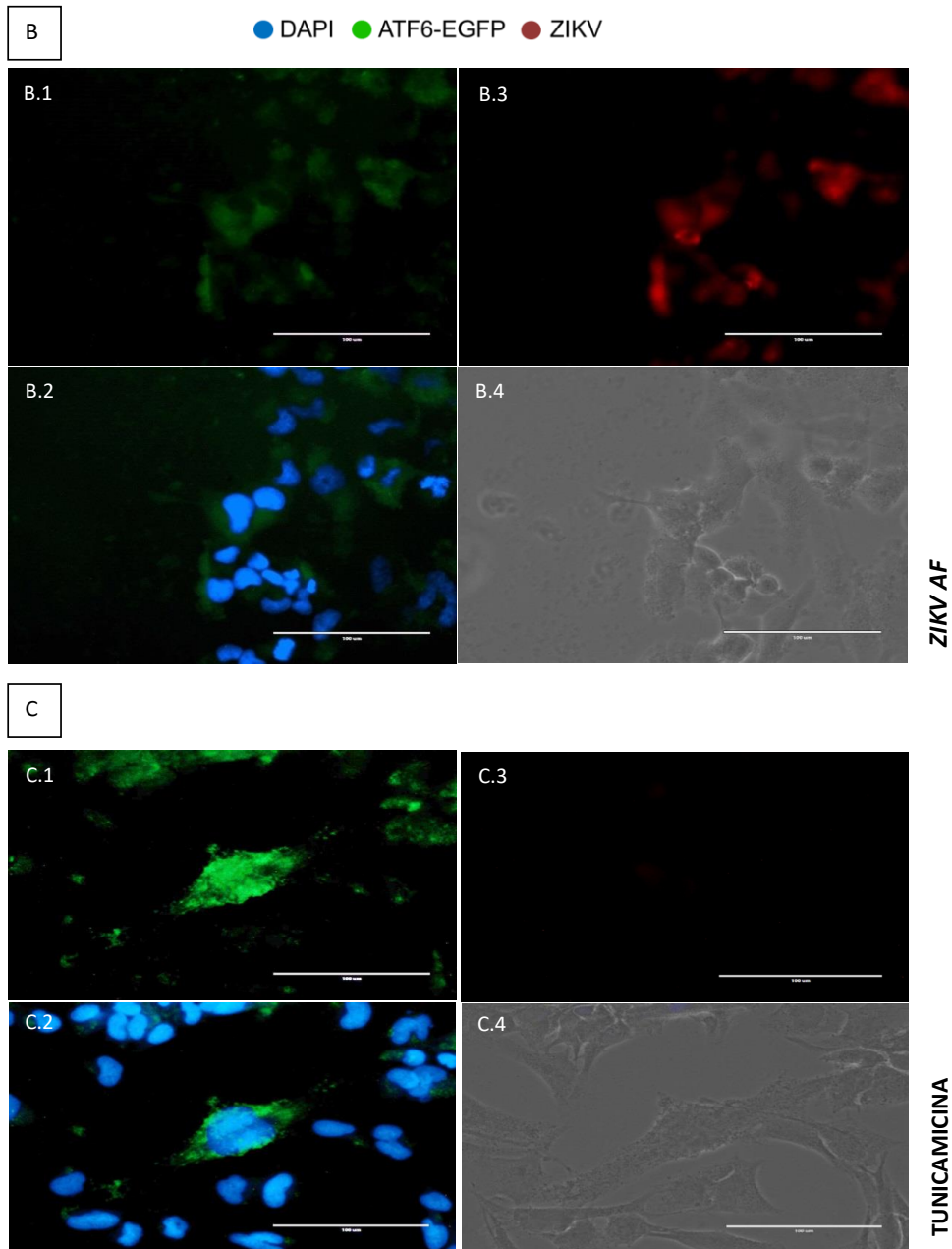
Outros estudos compararam a infecção por amostras asiáticas e africanas e mostraram que os ZIKV de origem africana infectaram mais células, mostraram títulos mais altos e induziram a morte celular precoce com mais frequência do que as amostras de ZIKV de linhagem asiática (ANFASA *et al.*, 2017; SHERIDAN *et al.*, 2018).

## 6.2 EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO ATF6 DA VIA UPR

### 6.2.1 Ativação de ATF6-GFP em células T98G infectadas por ZIKV

O ensaio com microscopia confocal verificou se houve a translocação de ATF6, do citoplasma para o núcleo, em células T98G infectadas por *ZIKV AS* ou *ZIKV AF* transfectadas com plasmídeo contendo o gene de ATF6 fusionado a proteína verde fluorescente (EGFP). A avaliação da ativação do braço ATF6 da via UPR por microscopia de fluorescência sugere que o vírus *Zika* modula negativamente a ativação de ATF6, uma vez que não foi detectada a sua translocação para o núcleo após a transfecção de plasmídeo contendo ATF6-EGFP. A Figura 19, painéis A (A.1-A.4) e B (B.1-B.4), mostram ausência da co-localização da cor verde (ATF6-GFP) e da cor azul (marcação do núcleo celular), ao contrário do que pode ser observado na presença do indutor de estresse celular tunicamicina (Figura 19, painel C, C.1-C.4) que mostra a sobreposição de cores verde e azul indicando o deslocamento de ATF6-GFP para o núcleo.

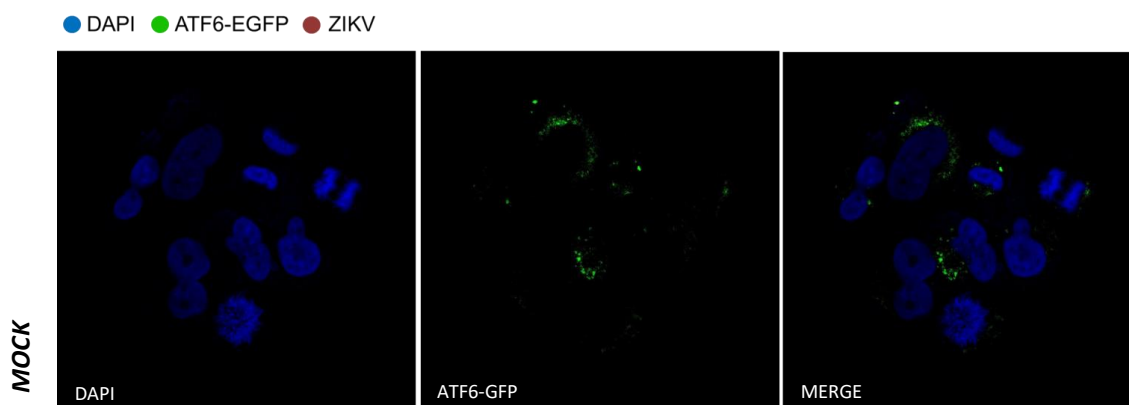




**Figura 19: Translocação de ATF6-EGFP.**

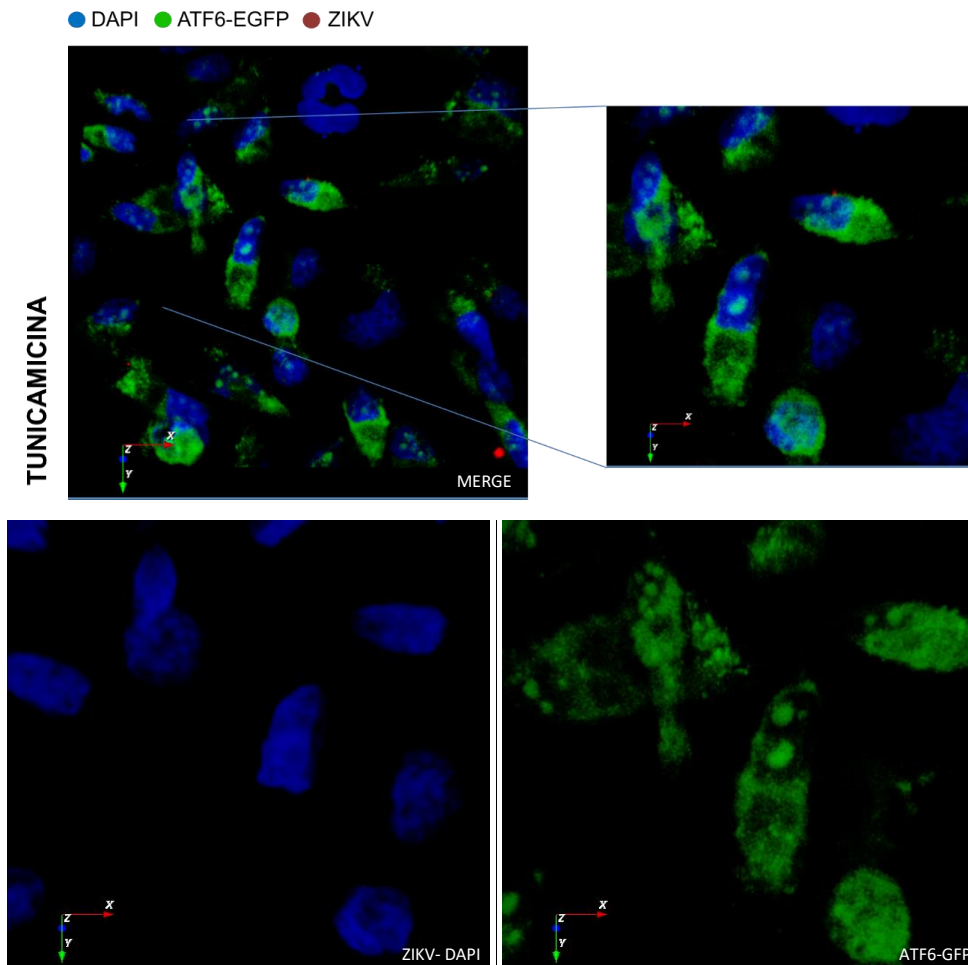
A translocação de ATF6 para o núcleo das células T98G, na presença da infecção pelo vírus *ZIKV AS* (A) ou *ZIKV AF* (B), foi avaliada através de transfecção com plasmídeo contendo ATF6 marcado com proteína fluorescente verde (GFP). As células T98G transfectadas foram infectadas com ZIKV e após 72 horas marcadas com *anti-Flavivirus 4G2* (1:50), em vermelho. O núcleo celular foi marcado em azul (DAPI). Como controle positivo de indução do estresse celular foi utilizado tunicamicina (c). Em A.1, B.1 e C.1 mostra a proteína ATF6-GFP; em A.2, B.2 e C.2 a sobreposição de ATF6-GFP e DAPI; em A.3, B.3 e C.3a marcação do ZIKV e em A.4, B.4 e C.4 as células T98G em microscopia de campo claro de *ZIKV AS*, *ZIKV AF* e tunicamicina, respectivamente.

Para visualizar de forma mais ampla, o ensaio de transfecção com ATF6-EGFP e imunomarcação com anti-flavivírus foi realizado sob as mesmas condições e as imagens foram detectadas em microscopia confocal de fluorescência. A análise da translocação de ATF6-EGFP em células T98G infectadas por *ZIKV AS* (Figura 22) ou *ZIKV AF* (Figura 23), foi realizada por este método com o objetivo de dirimir qualquer dúvida existente pela limitação inerente à técnica de microscopia de fluorescência convencional, já que a microscopia confocal permite a obtenção das imagens por camadas que sobrepostas geram imagem em 3D e a partir das mesmas é possível mostrar a célula como um todo e explicitar com maior amplitude a localização das marcações. Para comparação, o mesmo ensaio foi realizado em células não infectadas (*mock*) (Figura 20) e células tratadas com indutor de estresse celular (tunicamicina) (Figura 21).



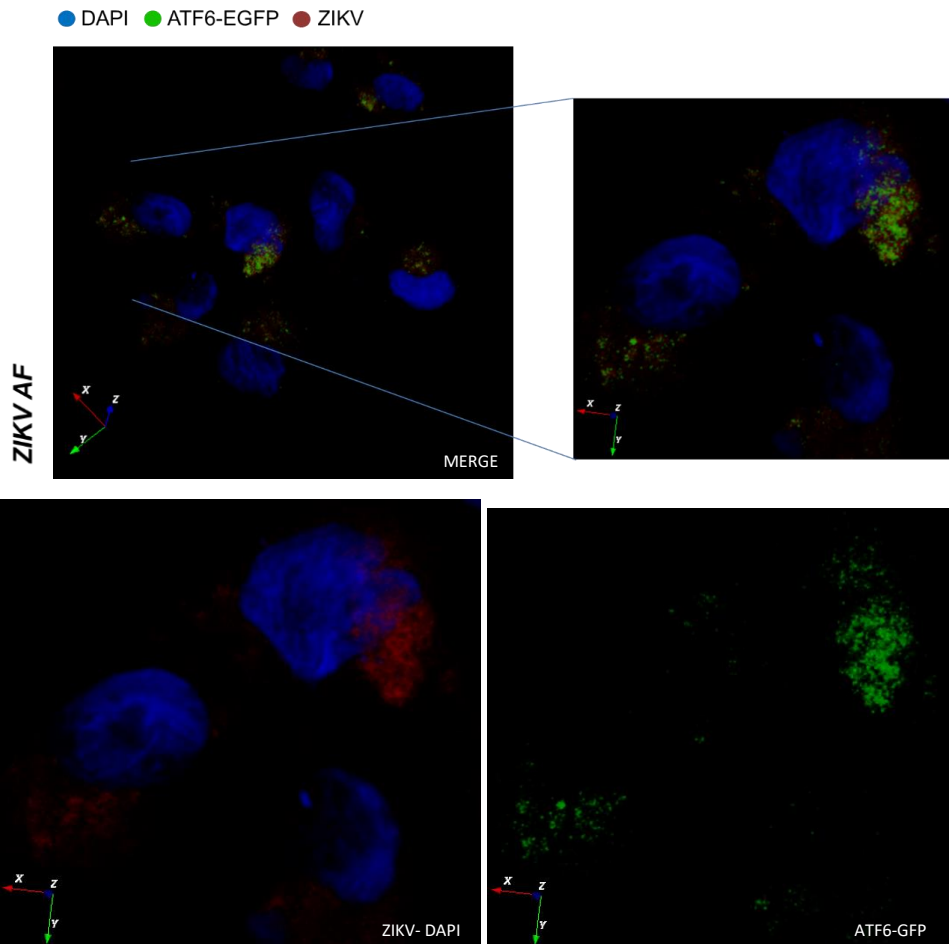
**Figura 20: Localização celular de ATF6-EGFP em células não infectadas com ZIKV.**

Microscopia confocal de fluorescência de células T98G transfectadas com plasmídeo contendo ATF6-EGFP de expressão constitutiva, em células não infectadas (*mock*), para controle da não translocação de ATF6 fusionada com EGFP em células não infectadas por ZIKV. A marcação do núcleo em azul (DAPI), em vermelho o Zika virus (*anti flavivirus*/ TRITC) e em verde a proteína verde fluorescente (EGFP) ligada a ATF6. As imagens foram feitas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti, em aumento de 40x. A confecção da imagem em 3D foi feita no programa *Icy bioimageanalysis*.

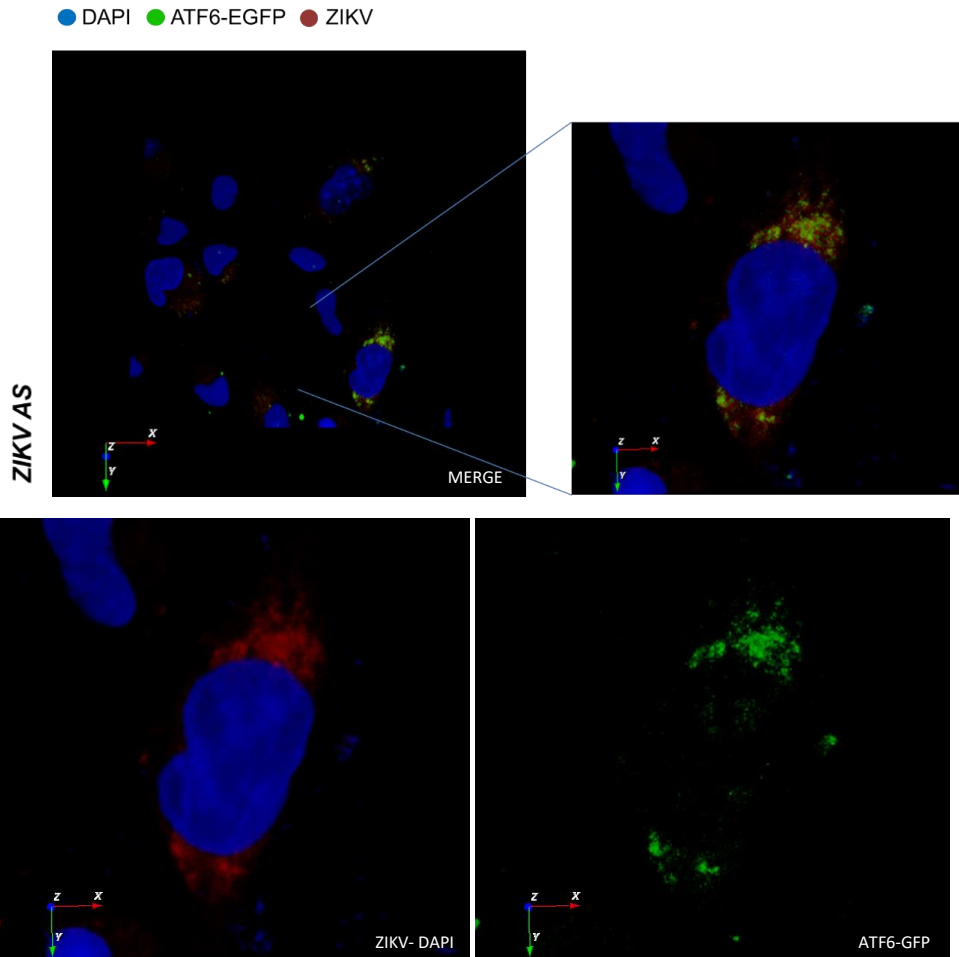


**Figura 21: Imagem confocal de células T98G com ATF6-EGFP sob o efeito de estresse celular por Tunicamicina.**

Microscopia confocal de fluorescência de células T98G transfectadas com plasmídeo contendo ATF6-EGFP de expressão constitutiva, sob indução de estresse celular com tunicamicina. Como controle da translocação de ATF6 fusionada com EGFP as células foram tratadas com tunicamicina (1 $\mu$ g/mL) um inibidor da N-glicosilação, por 24 horas, para induzir o estresse celular e, portanto, a translocação de ATF6-EGFP para o núcleo das células. A marcação do núcleo em azul (DAPI), em vermelho o Zika virus (*anti flavivirus*/ TRITC) e em verde a proteína verde fluorescente (EGFP) ligada a ATF6. Observa-se que a proteína verde fluorescente que encontra-se ligada a ATF6 se localiza na região nuclear das células na indução do estresse por tunicamicina. As imagens foram feitas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti, em aumento de 40x. A confecção da imagem em 3D (indicada pelos vetores X, Y, Z) foi feita no programa *Icy bioimageanalysis*.



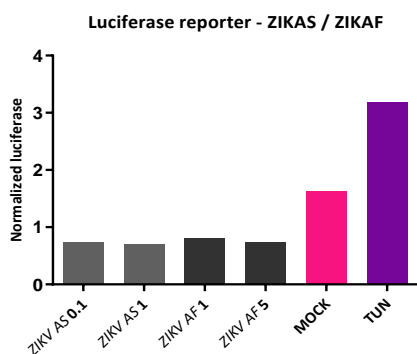
**Figura 22: Imagem confocal de células T98G com ATF6-EGFP sob o efeito da infecção pelo ZIKV AF.** Microscopia confocal de fluorescência de células T98G transfectadas com plasmídeo contendo ATF6-EGFP de expressão constitutiva, infectadas por ZIKV AF. Observa-se que não ocorre a translocação de ATF6-EGFP para o núcleo, indicando a não ativação deste sensor nas condições estudadas (MOI 1, 72 hpi). A marcação do núcleo em azul (DAPI), em vermelho o Zika virus (*anti flavivirus/ TRITC*) e em verde a proteína verde fluorescente (EGFP) ligada a ATF6. Observa-se que a proteína verde fluorescente que encontra-se ligada a ATF6 se localiza na região nuclear das células na indução do estresse por tunicamicina. As imagens foram feitas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti, em aumento de 40x. A confecção da imagem em 3D (indicada pelos vetores X, Y, Z) foi feita no programa *Icy bioimageanalysis*.



**Figura 23: Imagem confocal de células T98G com ATF6-EGFP sob o efeito da infecção pelo ZIKV AS.** Microscopia confocal de fluorescência de células T98G transfectadas com plasmídeo contendo ATF6-EGFP de expressão constitutiva, infectadas por ZIKV AS. Observa-se que não ocorre a translocação de ATF6-EGFP para o núcleo, indicando a não ativação deste sensor nas condições estudadas (MOI 1, 72 hpi). A marcação do núcleo em azul (DAPI), em vermelho o Zika virus (anti flavivirus/ TRITC) e em verde a proteína verde fluorescente (EGFP) ligada a ATF6. As imagens foram captadas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti, em aumento de 40x. A confecção da imagem em 3D (indicada pelos vetores X, Y, Z) foi feita em *software Icy bioimageanalysis*.

### 6.2.2 Atividade transcricional de ATF6 em células T98G infectadas por ZIKV

A ativação do braço ATF6 da via de UPR em células infectadas por *ZIKV* também foi avaliada por ensaios com gene repórter clonado no plasmídeo pOFlucGL3 contendo cinco cópias de sítios de ligação do ATF6. Para verificar a atividade transcricional de ATF6 na presença do vírus *Zika* foi empregado o ensaio do gene repórter da luciferase, no qual o ATF6 celular ativado, endógeno, é capaz de se ligar às cópias do sítio de ligação no plasmídeo transfectado induzindo assim a expressão da luciferase (WANG *et al.*, 2000). O uso de genes repórter, como o que codifica a proteína luciferase, permite a verificação da atividade desta enzima, cuja transcrição é induzida pela ligação do fator ativador de transcrição 6. Após transfecção com o plasmídeo repórter, as células foram infectadas com *ZIKV AS* ou *ZIKV AF*, em MOI altas ou baixas de vírus, e as leituras para detecção de luciferase até 72 hpi mostraram que não houve expressiva atividade transcricional de ATF6, já que baixos níveis de expressão de luciferase foram detectados, tanto para células infectadas com *ZIKV* quanto para o controle negativo de células não infectadas (mock). Já para o controle de estresse celular houve alta expressão e detecção de luciferase, comprovando a ativação da atividade transcricional de ATF6 nestas condições (Figura 24).



**Figura 24: Inibição da ativação transcricional de ATF6 na infecção pelo *ZIKV AS* ou *ZIKV AF* em células T98G em ensaio do gene repórter da Luciferase.**

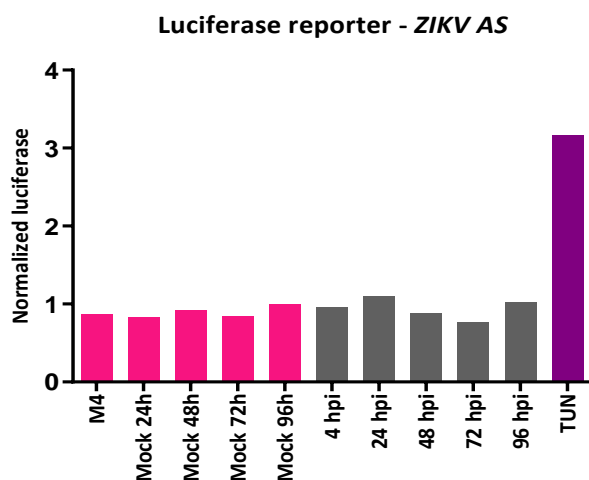
Células T98G transfectadas com plasmídeos contendo sítios de ATF6 para indução da expressão de luciferase foram infectadas com *ZIKV AS* 0,1 (MOI 0,1), *ZIKV AS* 1 (MOI 1), *ZIKV AF* (MOI 1) ou *ZIKV AF* (MOI 5) em 72 hpi. Observa-se que na infecção pelo *ZIKV AS* ou pelo *ZIKV AF* os níveis de luciferase detectados pelo teste se equivalem ao controle negativo do experimento (mock) o que indica não ativação de ATF6. O controle de estresse celular, Tunicamicina (TUN), mostra a ativação da atividade

transcricional de ATF6. (Mock = controle de células não infectadas, Tunicamicina = controle de estresse celular).

Observou-se que mesmo com MOIs mais altas do vírus Zika não há ativação da transcrição e produção da luciferase induzida por ATF6, quando comparado ao controle de células não infectado, ou seja, na ausência de indução de estresse e ao controle de estresse celular (tunicamicina). Estes resultados corroboram os dados obtidos na análise da ativação de ATF6 e translocação para o núcleo celular por microscopia de fluorescência.

Tendo definido que a não ativação de ATF6 em ensaios com plasmídeo contendo gene repórter da luciferase se mostrou independente de multiplicidade de infecção ou amostra viral, nós nos perguntamos, em seguida, se a não-ativação de ATF6 também se manteria em tempos anteriores ou posteriores às 72 horas pi, tempo observado no experimento ilustrado na Figura 24.

Assim, em outro ensaio, células T98G transfectadas com p5x-ATF6-GL3 foram avaliadas em relação aos outros tempos de infecção. Em intervalos de tempos 4, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção (Figura 25) o perfil se manteve em células infectadas com *ZIKV AS* (MOI 1), ou seja, não foi detectada a ativação da atividade transcricional de ATF6 quando comparado ao controle negativo de células não infectadas (mock) e ao controle de estresse (tunicamicina) em tempos diferentes de infecção.

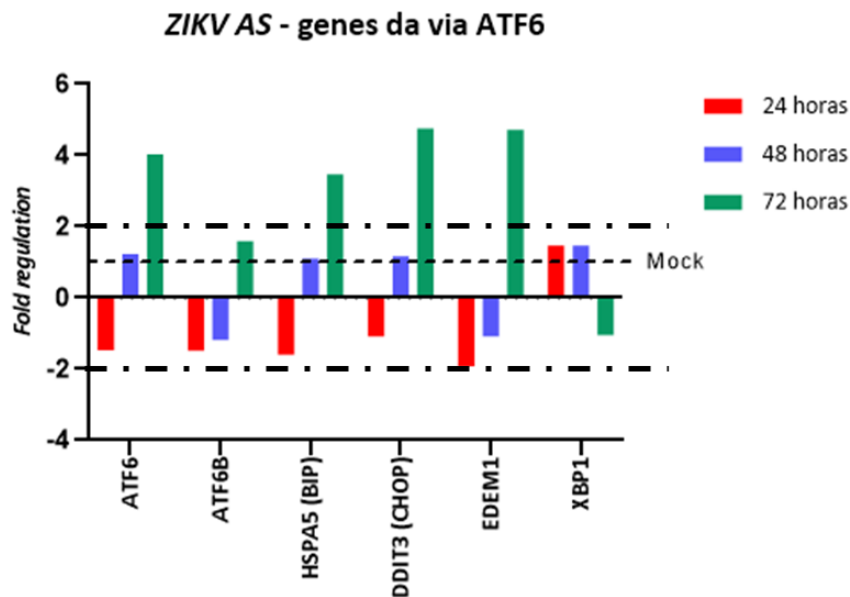


**Figura 25: Inibição da ativação transcricional de ATF6 na infecção pelo ZIKV AS em células T98G em intervalos de tempos (hpi) em ensaio do gene repórter da Luciferase.**

Células T98G foram transfectadas com plasmídeos contendo sítio de ATF6 para indução da expressão de luciferase e posteriormente, infectadas com ZIKV AS (MOI 1) e avaliadas em intervalos de tempo de 4, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção (hpi). Observa-se que na infecção pelo ZIKV AS não houve elevação dos níveis de luciferase quando comparado ao controle de células não infectadas (Mock) em cada tempo correspondente ao das células infectadas (Mock 4, 24, 48, 72 e 96 horas) o que indica a não ativação da via de ATF6. A ativação da via e a funcionalidade do método utilizado são comprovadas pelo tratamento das células com o indutor estresse celular, a tunicamicina, que mostrou elevada ativação de ATF6 pela indução da Luciferase em níveis mais altos em relação ao controle negativo e às células infectadas (M= Mock = controle de células não infectadas, TUN = Tunicamicina = controle de estresse celular, H = horas).

### 6.2.3 Expressão de genes do braço ATF6 em ensaio de matriz de PCR quantitativa em tempo real (*Quantitative real time-PCR array*)

Ainda para avaliar o braço ATF6 da via UPR, realizamos ensaio de RT-qPCR ARRAY no qual foi avaliada a expressão de genes importantes da via. Os resultados mostram que os genes relacionados ao sensor ATF6: genes que dão origem ao sensor ATF6 e seus produtos HSPA5 (BIP), DDIT3 (CHOP) e EDEM1 têm sua expressão aumentada apenas em 72 hpi, exceto o gene de XBP1, que manteve sua expressão próxima ao controle não infectado (Figura 26).



**Figura 26: Expressão de genes do braço ATF6 da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS.**

A expressão gênica de genes relacionados ao braço ATF6 da via UPR foi monitorada em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. O sensor ATF6 (4,0299) e seus produtos HSPA5 (3,4729), DDIT3 (4,7527) e EDEM1 (4,7143) têm sua expressão aumentada apenas em 72 hpi, exceto o gene de XBP1, que manteve próximo ao controle não infectado. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

O fator de transcrição ATF6 tem papel principal na indução da expressão de chaperonas, como GRP78 e PDI, na ativação da transcrição de genes que promovem a degradação de proteínas não dobradas como EDEM1 (ER-degradation enhancing-a-mannosidase-like protein 1) e de outras proteínas UPR, como CHOP e XBP1. Alguns estudos mostram também que ATF6 pode ativar tanto mecanismos de defesa da célula, quando em níveis mais baixos, quanto em mecanismos de destruição celular, ativando moléculas pro-apoptóticas, em níveis mais elevados (YOSHIDA *et al.*, 2001; BELMONT *et al.*, 2008; MORISHIMA *et al.*, 2011; SOVOLYOVA *et al.*, 2014).

O perfil de modulação negativa do braço ATF6 durante a infecção pelo ZIKV foi observado nas infecções das células T98G, para ambas as amostras asiática e africana e

em ambos os testes realizados: detecção de ATF6-GFP nuclear, ensaio de gene repórter e para ZIKV AS no ensaio do perfil transcricional avaliado por um arranjo de PCR. O ZIKV é um vírus que se multiplica de forma associada especificamente ao RE. Portanto, a não ativação de ATF6 é significativa, uma vez que apenas presença do vírus neste local deveria ser suficiente para ativar este sensor.

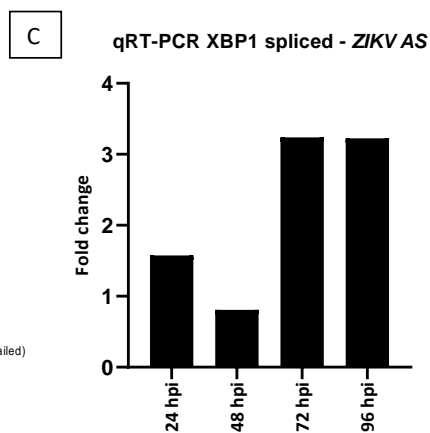
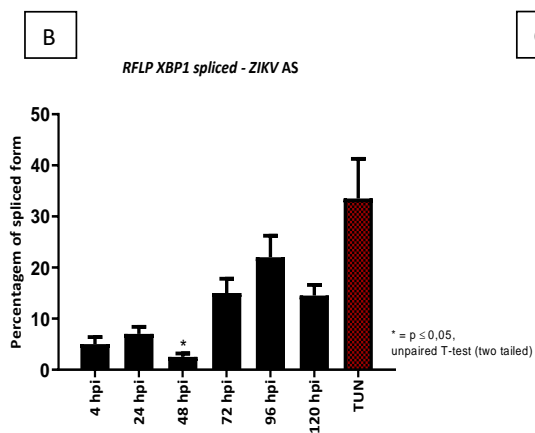
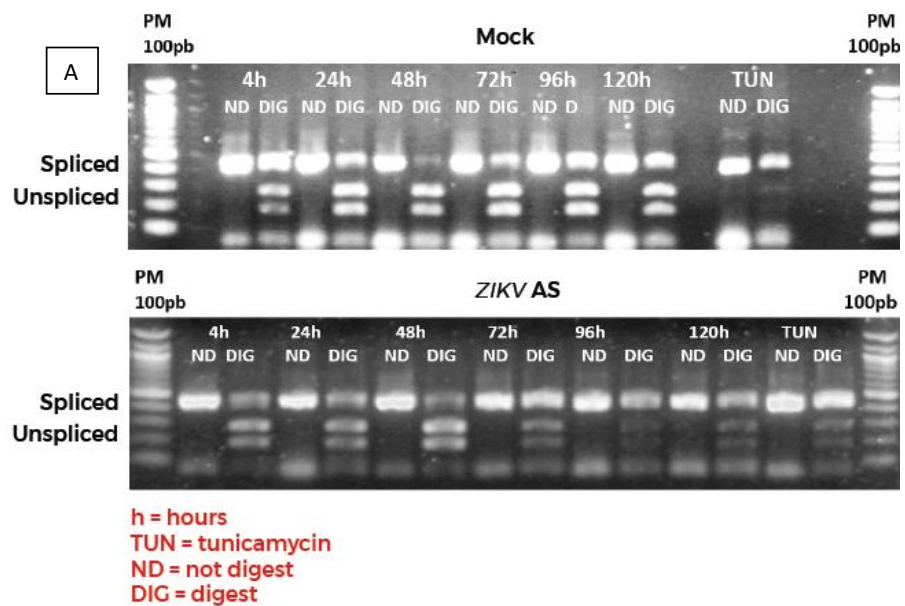
Os resultados mostram que ATF6 parece não estar ativada mesmo tendo níveis aumentados de expressão gênica, o que foi demonstrado em vários ensaios de visualização da translocação de ATF6 para o núcleo, pela marcação com proteína verde fluorescente e pela verificação da atividade transcricional através do ensaio do gene repórter da luciferase. Além destes, ensaios de citometria para detecção da proteína verde fluorescente em núcleos extraídos, também não detectaram a presença de ATF6 (dados não apresentados). Estudos que avaliaram a ativação do sensor ATF6 apresentaram discrepâncias em relação aos resultados encontrados. *GLADWYN-NG e colaboradores (2018)* não detectaram clivagem aumentada de ATF6 ou aumento no seu produto XBP1. No entanto, *Tan e colaboradores (2018)* detectaram regulação positiva de ATF6 durante a infecção pelo ZIKV em ensaios *in vitro* e *in vivo*. No entanto, ainda neste estudo, em relação ao produto desta via, o XBP1, também não foi detectado o aumento do mRNA da forma não processada desta proteína. A regulação negativa da ativação de ATF6 durante a replicação viral pode ser vantajosa para o vírus já que esta via tem como produtos diretos genes associados tanto a degradação proteica quanto a ativação de apoptose, como CHOP, também presente na via de PERK, que atua como ativador de vias apoptóticas. Assim o ZIKV consegue manter o dobramento das proteínas virais e a célula em condições viáveis por um período mais prolongado.

### **6.3 EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO IRE1/XBP1 DA VIA UPR**

#### **6.3.1 Processamento do RNA mensageiro de XBP1 por IRE1**

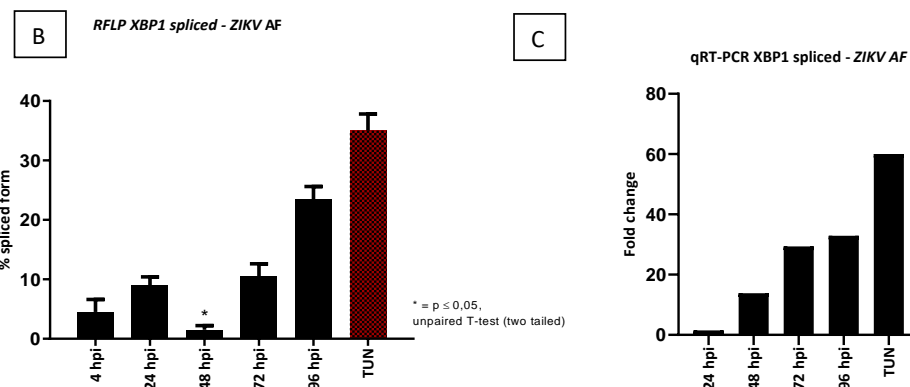
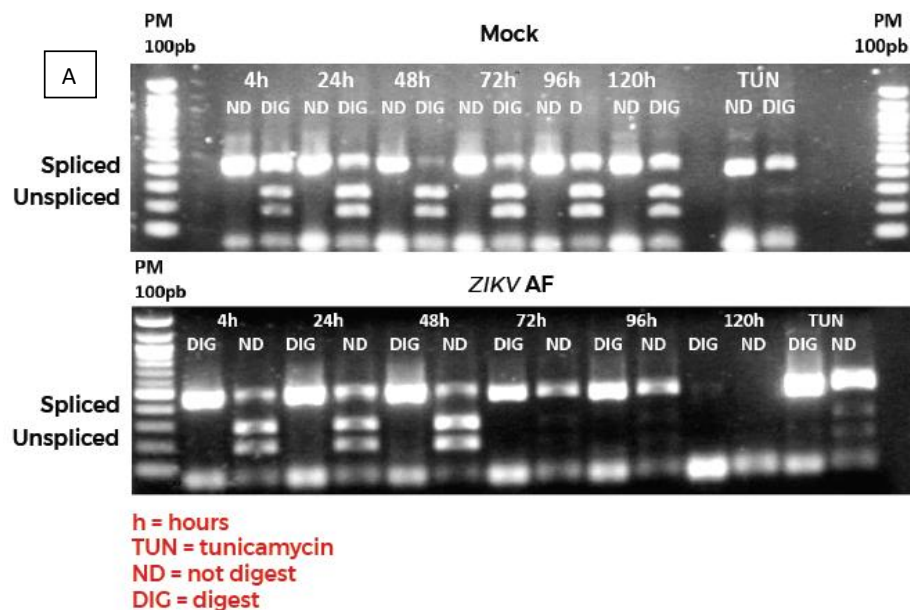
Para avaliar o braço IRE1 da via UPR, investigamos o fator de transcrição XBP1, uma molécula que atua a jusante na cascata de sinalização deste sensor da via de resposta ao estresse do RE. Durante o estresse do RE, IRE1 $\alpha$  dimeriza e autofosforila levando a ativação do seu domínio endonuclease. Este remove um íntron residual de 26 nucleotídeos do mRNA de XBP1, resultando na isoforma mais estável e ativa da proteína do fator de transcrição XBP1 (KORENNYKH *et al.*, 2011; HETZ *et al.*, 2011).

Com isso, para avaliar se ocorre a ativação do braço IRE1 da via UPR durante a infecção por ZIKV, investigamos o processamento do fator de transcrição XBP1 em células T98G após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção (hpi) com uma *moi* de 1, utilizando ensaios de PCR-RFLP, densitometria e PCR quantitativo. Os resultados sugerem que ocorre elevação da ativação do processamento de XBP1 após 72 hpi quando comparado aos tempos de 24, 48 hpi, com menores níveis de processamento do mRNA desta proteína em 48 horas após a infecção. Em 48 hpi as análises mostraram modulação negativa da via IRE1/XBP1, tanto pela diminuição da presença da forma processada em ensaio de PCR-RFLP, apresentado em gel de agarose e na forma gráfica na avaliação por densitometria das bandas específicas; quanto pela detecção da forma processada através de qPCR, quando avaliadas a amostra asiática (ZIKV AS) (Figura 27, painéis A, B e C) e a amostra africana (ZIKV AF) (Figura 28, painéis A, B e C). No controle de estresse, as células tratadas com 1  $\mu$ M de tunicamicina também conferem a ativação do processamento de XBP1, como esperado.



**Figura 27: Processamento do mRNA de XBP1 por IRE1 na infecção por ZIKV AS.**

O polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os ZIKV AS foi observado por visualização após fracionamento eletroforético dos amplicons em gel de agarose 1% (A). Transcritos de mRNA de XBP1 foram amplificados por RT-PCR, digeridos com PstI e fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A forma processada, XBP1s, não possui sítio de restrição para PstI e migra mais lentamente que a forma não processada, XBP1u. A relação entre a quantidade das bandas correspondente a forma processada de XBP1 em relação a quantidade total é apresentada no gráfico (B), pela quantificação das bandas correspondentes a forma íntegra e a forma processada de XBP1 em programa ImageJ (NIH). Observa-se modulação da via IRE1/XBP1, com menor ativação em 48 horas de infecção (os resultados são apresentados pela média  $\pm$ SD de 2 experimentos independentes da porcentagem da forma processada em relação a quantidade total de XBP1). O mesmo perfil pode ser observado nos ensaios por PCR quantitativo utilizando-se primers com sítios específicos para a forma processada de XBP-1 (C). Em todos os ensaios o controle de indução de estresse do RE tunicamicina (TUN) apresentou indução do processamento de XBP1.



**Figura 28: Processamento do mRNA de XBP1 por IRE1 na infecção por ZIKV AF.**

O polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os ZIKV AF foi observado por visualização após fracionamento eletroforético dos amplicons em gel de agarose 1% (A). Transcritos de mRNA de XBP1 foram amplificados por RT-PCR, digeridos com PstI e fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A forma processada, XBP1s, não possui sítio de restrição para PstI e migra mais lentamente que a forma não processada, XBP1u. A relação entre a quantidade das bandas correspondente a forma processada de XBP1 em relação a quantidade total é apresentada no gráfico (B), pela quantificação das bandas correspondentes a forma íntegra e a forma processada de XBP1 em programa ImageJ (NIH). Observa-se modulação da via IRE1/XBP1, com menor ativação em 48 horas de infecção (os resultados são apresentados pela média  $\pm$ SD de 2 experimentos independentes da porcentagem da forma processada em relação a quantidade total de XBP1). Em ensaio por PCR quantitativo utilizando-se primers com sítios específicos para a forma processada de XBP1 há maior ativação nos tempos mais tardios, no entanto, não mostrou a modulação em 48hpi (C). Em todos os ensaios o controle de indução de estresse do RE tunicamicina (TUN) apresentou indução do processamento de XBP1.

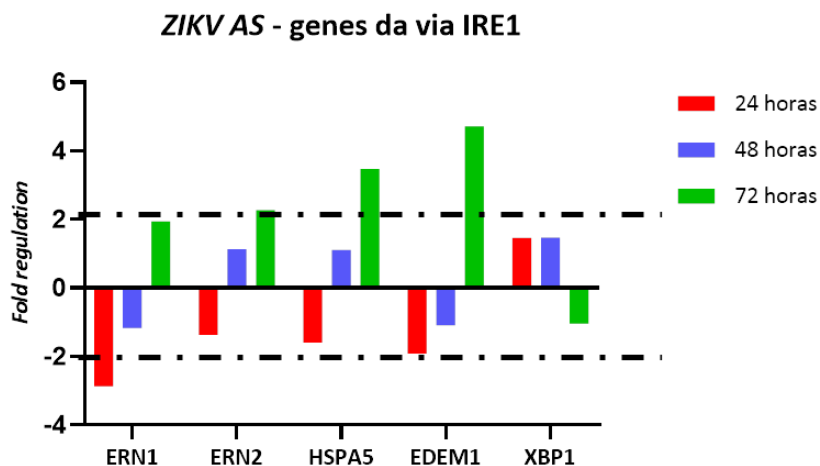
Em nossos ensaios de RT-PCR-RFLP e qPCR, o ZIKV mostrou um aumento da ativação do processamento do mRNA de XBP1 em todos os tempos, mais elevado em 72 horas após infecção, entretanto, obteve-se expressivo decaimento do processamento do mRNA desta molécula em 48 horas após a infecção, o que sugere uma modulação negativa da via IRE1-XBP1 neste tempo, o que foi observado nas duas técnicas utilizadas, pela avaliação da densitometria de bandas específicas de XBP1 processada e pela detecção da forma processada através de RT-qPCR, para ambas as amostras, asiática (*ZIKV AS*) e africana (*ZIKV AF*). No entanto, cabe ressaltar que para a amostra africana no tempo de 48 hpi não houve o decréscimo esperado deste tempo em relação à 24 hpi, o que pode estar relacionado a erro experimental, uma vez que o perfil mostrado pela técnica de RFLP mostrou-se semelhante ao apresentado pela amostra asiática. Especificamente para os *Flavivirus*, como, por exemplo, para DENV, JEV e também para o *Zika virus*, em modelos distintos, alguns estudos demonstraram que há ativação da resposta a UPR, com ativação da via de sinalização de XBP1 (GLADWYN-NG *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2018; UMAREDDY *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2006).

Estes resultados sugerem que o *ZIKV*, no caso das duas amostras estudadas, modula a ativação do braço IRE1 da via UPR, em fases mais precoces da infecção, diminuindo o processamento pós-transcricional do fator de transcrição XBP1 pelo menos até dois dias após a infecção. Resultado similar foi observado em estudo realizado em células-tronco neurais humanas que obteve uma ativação modesta do IRE1 em 48 horas após infecção com *Zika virus* de uma amostra de origem asiática (GLADWYN-NG *et al.*, 2018).

### **6.3.2 Expressão de genes do braço IRE1 em ensaio de matriz de PCR quantitativa em tempo real (Quantitative real time-PCR array)**

O ensaio de RT-qPCR array pelo kit RT2 Profiler™ PCR Array Human Cellular Stress Responses (Qiagen) avaliou o perfil de expressão de mRNA de genes do braço IRE1, como das isoformas de IRE1 (ERN1 ou IRE1 $\alpha$  e ERN2 ou IRE1 $\beta$ ), BiP (HSPA5), componentes de degradação do RE (como por exemplo EDEM1) e de seu principal substrato XBP1 (Figura 29). Os achados mostram a tendência para elevação da expressão gênica de genes do braço IRE1 em 72 hpi, o que também é indicado para a

ativação da via, pela averiguação do processamento de XBP1, que mostrou modulação negativa em 48 hpi e portanto, inibição deste braço em estágios precoces da infecção.



**Figura 29: Expressão de genes do braço IRE1 da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS.**

A expressão de genes relacionados ao braço IRE1 da via UPR foi monitorada em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. O sensor IRE1 (ERN1 ou IRE1 $\alpha$  e ERN2 ou IRE1 $\beta$ ), BiP (HSPA5), componentes de degradação do RE (como por exemplo EDEM1) tiveram expressão de seus genes aumentada em 72 hpi. Já seu principal substrato XBP1 não mostrou aumento de expressão até este período. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

A modulação da via IRE1 em estágios iniciais da infecção é satisfatória para a produção viral uma vez que sabe-se que esta via leva a degradação de mRNA associados a membrana, pelo braço RIDD, ou mesmo pela degradação global de proteínas através da regulação de componentes da maquinaria ERAD. O fator de transcrição XBP1 é capaz de induzir a expressão de enzimas envolvidas na degradação associada ao RE (ERAD) (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002; JURKIN *et al.*, 2014).

Ademais, analisando os dados obtidos no contexto de apoptose, a modulação de IRE1, pode ser interessante uma vez que este sensor sob estresse prolongado está diretamente associado a vias de morte celular, pela ativação de ASK1/JNK (apoptosis signaling-regulating kinase/c-jun-N-terminal kinase) através do complexo IRE1 /TRAF2

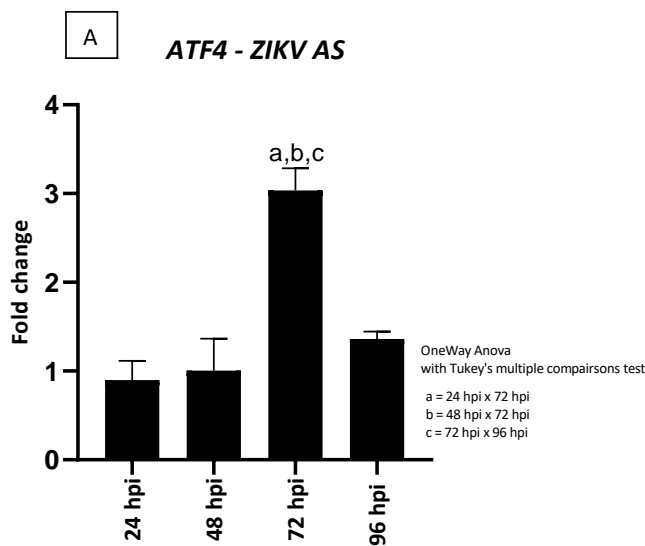
(tumor necrosis associated factor 2). Sendo assim, esta via pode, pelo menos em parte, mediar a apoptose sob condições irreversíveis de estresse do RE. (HETZ & GLIMCHER, 2009). Isso é particularmente interessante, já que teoricamente há um período de intensa síntese proteica viral dentro do RE, o que poderia fatalmente induzir o estresse do retículo e limitar a produtividade viral. Evitando uma sobrecarga na regulação do estresse do RE pela via IRE1 neste período o vírus garantiria sua produtividade, ao passo que, em fases mais tardias essa modulação já não seria tão necessária, uma vez que o vírus já estaria próximo de seu processo final de maturação e liberação da célula infectada. De fato, à medida que o ciclo progride para suas fases percebe-se apenas a ativação contínua e crescente do sensor IRE1 $\alpha$ .

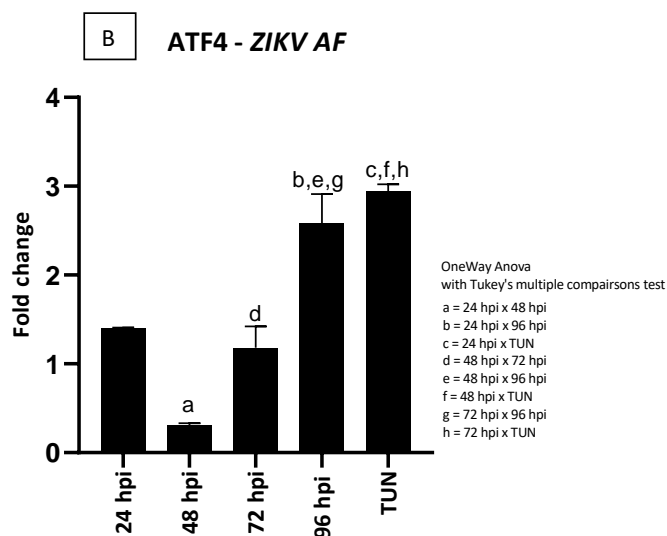
## 6.4 EFEITO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA SOBRE A ATIVAÇÃO DO BRAÇO PERK DA VIA UPR

### 6.4.1 Expressão de genes a jusante do braço PERK na infecção por ZIKV

Com o objetivo de comparar os níveis de mRNA de genes do braço PERK da via UPR de células T98G infectadas com *ZIKV AS* ou *ZIKV AF* e células T98G não infectadas, o RNA total de células infectadas por 24, 48, 72, e 96 horas com uma MOI de 1 e não infectadas, foram analisados por PCR quantitativa para determinar os níveis de ATF4 e CHOP (que são elementos centrais da cascata de sinalização de PERK).

Pelo ensaio de qPCR observa-se que há elevação dos níveis de ATF4 em valores biologicamente significativos, ou seja, maiores que 2, para a amostra asiática em 72 hpi e para a amostra africana em 96hpi (Figura 30, painéis A e B).



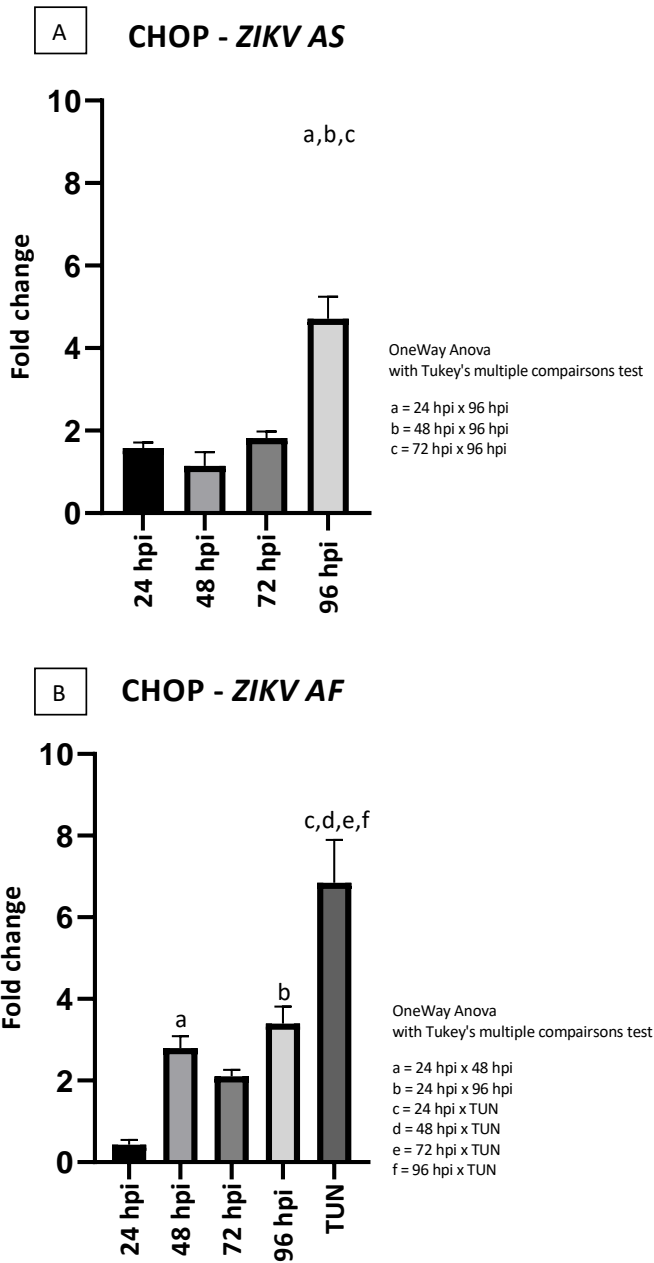


**Figura 30: Expressão relativa do gene ATF4 do braço PERK da via UPR na infecção de células T98G pelo vírus Zika.**

Ensaio de qRT-PCR realizado em RNA de extrato total de células T98G infectadas com A) Zika virus da amostra asiática (*ZIKV AS*) ou B) Zika virus da amostra africana (*ZIKV AF*), com iniciadores específicos para ATF4. Todos os testes foram realizados em triplicata, com MOI de 1, em tempos de intervalos de infecção de 24, 48, 72 e 96 horas e controle de estresse tunicamicina (TUN) em relação a células não infectadas (*fold change*). Os dados são apresentados como médias de dois de experimentos independentes.

O fator de transcrição 4 é um produto direto da via de PERK, estes dados mostram uma contenção desta resposta nos estágios iniciais da infecção, sugerindo que a regulação da tradução global de proteínas pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  pode estar sendo suprimida para favorecer a tradução de proteínas virais. O que ocorre em estágio mais tardio de infecção para a amostra africana que mantém a modulação negativa pelo menos até 72 hpi.

Neste ensaio, avaliou-se também a expressão do RNA mensageiro de CHOP, molécula induzida pela ativação da via PERK-ATF4, que em estresse prolongado do RE leva a ativação de vias de apoptose. A detecção de CHOP mostrou elevação níveis em valores biologicamente significativos apenas 96 hpi na infecção por *ZIKV AS* (Figura 31, painel A). Para a amostra africana a elevação da expressão gênica ocorreu mais precocemente já em 48 horas após a infecção (Figura 31, painel B).



**Figura 31: Expressão relativa do gene CHOP do braço PERK da via UPR na infecção de células T98G pelo vírus Zika.**

Ensaio de qRT-PCR realizado em extrato total de RNA de células T98G infectadas com A) Zika virus da amostra asiática (*ZIKV AS*) ou B) Zika virus da amostra africana (*ZIKV AF*), com iniciadores específicos para CHOP. Todos os testes foram realizados em triplicata, com MOI de 1, em tempos de intervalos de infecção de 24, 48, 72 e 96 horas e controle de estresse tunicamicina (TUN) e o resultado representa os

valores de expressão relativa em relação a células não infectadas (*fold change*). Os dados são apresentados como médias de dois experimentos independentes.

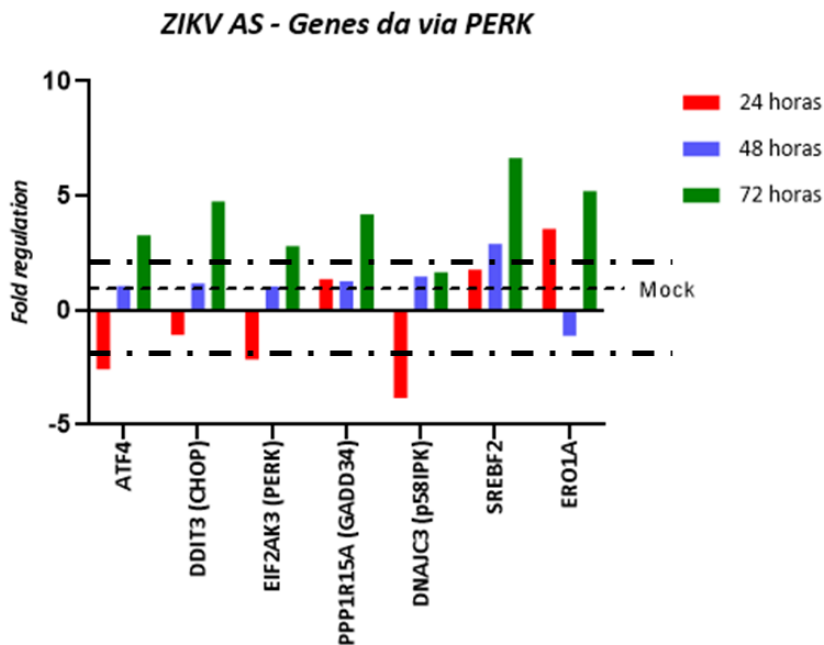
Apesar de CHOP ser conhecida como molécula pro-apoptótica, baixos níveis desta podem ter efeito citoprotetor importante, ampliando a ativação transcricional para regular o estresse (HARDING *et al.*, 2000a, MARCINIAK *et al.*, 2004).

A indução em estágio mais precoce de infecção pela amostra africana leva a uma prolongada ativação de CHOP e possivelmente à ativação acelerada de mecanismos apoptóticos, quando comparado à amostra asiática. Este contraste apresentado pelas duas amostras estudadas pode explicar a maior destruição celular e títulos mais elevados obtidos na infecção celular pela amostra africana quando comparada com a amostra asiática num mesmo tempo de infecção, que foi observado na caracterização da infecção no modelo celular estudado (item 4.1). Estes resultados concordam com a maior citopatogenicidade aparente da amostra africana, evidenciada pela maior morte celular apresentada, o que pode ser relacionada à maior ativação apoptótica. Em consonância aos dados descritos na literatura, a amostra asiática apresenta uma infecção mais crônica por controlar a ativação de vias apoptóticas, pelo menos nos estágios iniciais da infecção. Estes achados mostram que há modulação positiva da via de PERK, mas com maior indução nas fases mais tardias da infecção.

#### **6.4.2 Expressão de genes do braço PERK em ensaio de matriz de PCR quantitativa em tempo real (Quantitative real time-PCR array)**

O ensaio de RT-qPCR *array* pelo kit *RT2 Profiler™ PCR Array Human Cellular Stress Responses* (Qiagen) avaliou o perfil de expressão de mRNA de 84 genes da via UPR (descrito nos itens 5.6 e 6.6) e corroborou os resultados obtidos na análise por RT-qPCR utilizando primers específicos para ATF4 e CHOP, além de demonstrar o perfil de expressão gênica de outros alvos do braço PERK da via de resposta ao estresse do retículo endoplasmático (Figura 32). O ensaio de arranjo detectou uma inibição de ATF4 em 24 hpi (-2,5742) e indução da expressão em 72 hpi (3,2742). Já SREBF2, que controla a homeostase do colesterol, um componente de membrana, que possui sítio de ligação para o promotor de ATF4 (ROME *et al.*, 2008), foi induzido em 48 e 72 hpi

2,8917 e 6,6596 vezes, respectivamente. De fato, a indução da transcrição de ATF4 ocorre sequencialmente, após o início da elevação de SREBF2. Para CHOP (DDIT3) também houve aumento da expressão somente em 72hpi (4,7527) em relação às células não infectadas. Além destes, outros genes foram avaliados: o sensor PERK (EIF2AK3) foi inibido em 24 hpi (-2,1441) e induzido em 72 hpi (2,802). Já o gene relacionado à inibição do ramo de PERK, GADD34 (PPP1R15A), um desfosforilador de EIF2 $\alpha$ , teve aumento de aproximadamente 4 vezes em 72 hpi e o gene de p58IPK (DNAJC3), um inibidor direto de PERK não foi induzido em até 72 hpi, mas teve sua expressão inibida no início da infecção, em 24 hpi (-3,8315).



**Figura 32: Expressão de genes do braço PERK da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS.**

A expressão de genes relacionados ao braço PERK da via UPR foi monitorada em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. O ensaio de arranjo detectou uma inibição de ATF4 em 24 hpi (-2,5742) e indução da expressão em 72 hpi (3,2742). Já SREBF2 foi induzido em 48 e 72 hpi 2,8917 e 6,6596 vezes, respectivamente. CHOP (DDIT3) aumentou a expressão somente em 72hpi (4,7527) em relação às células não infectadas. O sensor PERK (EIF2AK3) foi inibido em 24 hpi (-2,1441) e induzido em 72 hpi (2,802). Já o gene relacionado à inibição do ramo de PERK, GADD34 (PPP1R15A), um desfosforilador de EIF2 $\alpha$ , teve aumento de aproximadamente 4 vezes em 72 hpi e o gene de p58IPK (DNAJC3), um inibidor direto de PERK não foi induzido em até 72 hpi, mas teve sua expressão inibida no início da infecção, em 24 hpi (-3,8315). Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerandos como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do

Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

Os dados obtidos no ensaio de matriz sugerem que a modulação de PERK avaliada pela expressão de genes detectou o aumento do mRNA somente após 72 hpi e que não houve indução de expressão gênica dos principais produtos desta via ATF4, GADD34 e CHOP até 48 hpi. Pelo ensaio de PCR quantitativo em experimentos independentes, a expressão de genes como ATF4 e CHOP, importantes sinalizadores desta via, mostrou uma tendência dinâmica de expressão continuamente aumentada ao longo da replicação viral pelo vírus ZIKV AS, sugerindo forte modulação positiva em fases mais tardias da infecção, como em 72 hpi e apenas uma transcrição modesta nos tempos mais precoces (24 e 48 hpi). Em conjunto, estes dados sinalizam para uma modulação do braço PERK da via UPR com mais ampla ativação após 72 horas de infecção pelo ZIKV, em ambas as técnicas utilizadas. A confecção de um ensaio de PCR quantitativo *in house*, bem como o tratamento dos dados de forma manual *versus* em programa computacional, pode ter ocasionado as discrepâncias apresentadas nos tempos mais precoces da infecção, que apesar de ter mostrado ativação da expressão gênica, esta foi bem mais modesta quando comparada ao tempo de 72 hpi.

PERK é um importante sensor de estresse do RE e pode regular a tradução de proteínas globais. Durante uma infecção viral, a ativação de PERK atenua a síntese de proteínas por fosforilação de eIF2 $\alpha$ , numa tentativa de impedir a produção das proteínas virais. No entanto, a infecção viral pode restaurar a síntese de proteínas globais em células hospedeiras influenciando GADD34 que ao restaurar a atividade de eIF2 $\alpha$  resulta na recuperação da síntese proteica através da reativação da via de produção de proteínas, mantendo a produção das proteínas tanto do hospedeiro como das proteínas virais (HARDING, *et al.*, 1999; NOVOA *et al.*, 2001). A ativação da transcrição de ATF4 em estágios mais avançados da infecção também pode ser satisfatória para a replicação viral uma vez que é sabido que alguns genes induzidos por ATF4 são anti-apoptóticos e podem promover a sobrevivência celular através da indução de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações oxidativas, resposta ao estresse e secreção de proteínas (HARDING *et al.*, 2000a), entretanto, ATF4 induz CHOP, que em estresse prolongado pode levar a ativação de vias apoptóticas.

A modulação de PERK foi avaliada por ensaios de detecção do mRNA de genes a jusante desta via além do próprio sensor. Neste estudo, foi detectada a modulação de PERK pela indução da expressão sugerindo que há ativação da via. A expressão de genes como ATF4 e CHOP, importantes sinalizadores desta via, na infecção pelo ZIKV, mostrou modulação positiva mais elevada em fase tardia da infecção, em 72 hpi. Outros trabalhos, utilizando amostras asiáticas de ZIKV, mostraram o aumento da produção de genes do braço PERK da UPR ou mesmo da fosforilação de eIF2 $\alpha$  após a infecção com ZIKV e, adversamente, a inibição da supressão da tradução global de proteínas e manutenção da tradução do genoma do RNA da resposta de estresse independente de eIF2 $\alpha$  (ROTH *et al.*, 2017; GLADWYN-NG *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2018). Estes ensaios cobrem em relação a ativação do braço PERK e mostraram que há a indução da expressão de genes relevantes associados ao braço PERK, como CHOP e GADD34, no entanto há discordância em relação ao ATF4 que não foi aumentado durante a infecção pelo ZIKV em estudo conduzido por TAN e colaboradores (2018). GADD34 uma vez aumentada pode restaurar a tradução da proteína durante a replicação do ZIKV, implicando que o ZIKV pode tirar proveito da síntese proteica da célula hospedeira.

A modulação de PERK é uma importante estratégia para manutenção da produção das proteínas do vírus bem como da sua permanência na célula, uma vez que esta via está associada à atenuação da produção global de proteínas pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  e, também, pela indução de apoptose via ATF4/CHOP. ATF4 atua como um fator de transcrição que ativa genes que codificam chaperonas, envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações oxidativas, resposta ao estresse e secreção de proteínas. Com isso pode promover a sobrevivência celular (HARDING *et al.*, 2000a). Entretanto, nem todos os genes induzidos por ATF4 são anti-apoptóticos. CHOP, que é um produto direto de ATF4, induz um membro da família oxidase do retículo endoplasmático, ERO1 (*Endoplasmic Reticulum Oxidase family member*), que sob estresse prolongado pode promover um ambiente de alta oxidação e ativar vias pró-apoptóticas citoplasmáticas de sinalização de cálcio o que leva a morte celular (MARCINIAK *et al.*, 2004; TABAS & RON, 2011). ERO1 teve elevação na expressão do seu gene em fase precoce (24 hpi) e fase tardia (72 hpi) da infecção. É importante ressaltar sua

modulação negativa em 48 hpi. A indução de ERO1 por CHOP ativa a liberação do canal de cálcio IP3R1 no RE, processo envolvido na ativação apoptose (Marciniak *et al.*, 2004). Nossos dados para ERO1 demonstram uma indução de 3,55; e 5,20 vezes deste mensageiro, em 24 e 72 hpi, respectivamente e com queda na expressão gênica para valor próximo a célula não infectada em 48 hpi, o que aponta para possível modulação da ativação de apoptose no decorrer da infecção. Neste contexto, a programação da via PERK no sentido de modular a produção de ATF4 e CHOP em períodos iniciais da infecção, mostrando exarcebação em fases mais tardias, parece ser importante estratégia para aumento da sobrevivência da célula e, conseqüentemente, a ampliação da replicação viral.

## 6.5 PRODUÇÃO DE CHAPERONAS EM CÉLULAS INFECTADAS POR ZIKV

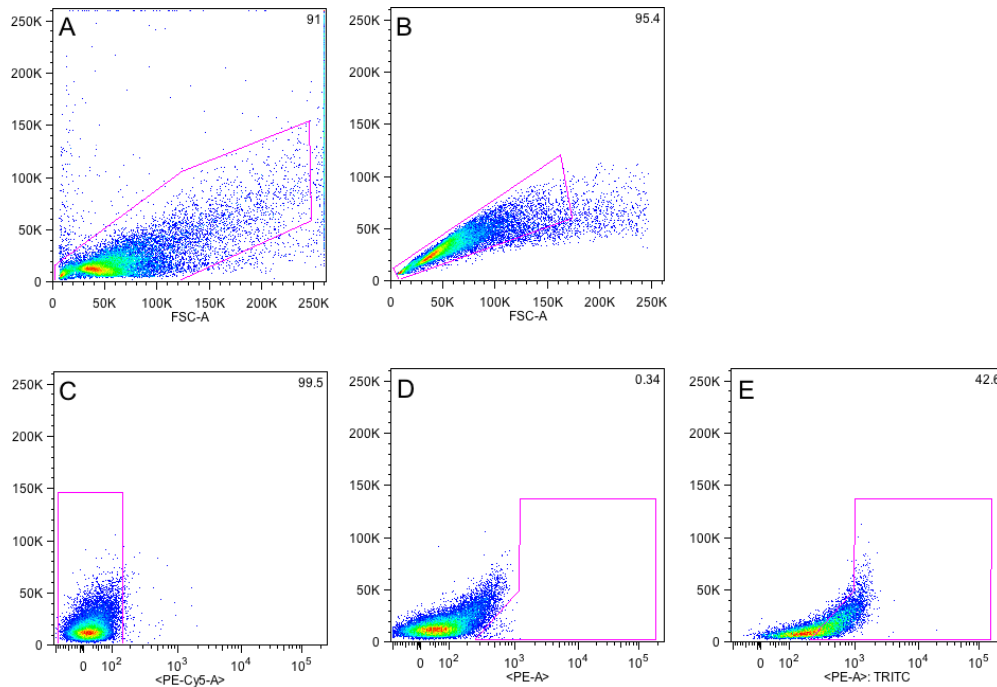
Com o objetivo de comparar os níveis de chaperonas importantes na via UPR, células infectadas por 48 e 72 horas (MOI de 1) e não infectadas, foram analisadas por Citometria de Fluxo, através de imunomarcacão com anticorpos específicos para BiP/GRP78 e Calregulina, para avaliar a expressão proteica destas chaperonas durante o processo de infecção. Foram utilizados como fluorocromos o TRITC, para identificacão das proteínas e 7AAD para marcacão de viabilidade celular.

Inicialmente foi realizada a identificacão da populacão a ser estudada quanto às propriedades físicas, isto é, quanto à tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 33, painel A), seguido da eliminacão de “doublets” e seleçã de “singlet cells” (Figura 33, painel B), quanto à altura e área (FSC-H x FSC-A).

Uma terceira *gate* foi desenhada para seleçã de células viáveis, ou seja, as células não marcadas pelo 7AAD (Figura 33, painel C). Por fim foi realizada a avaliacaõ de intensidade de fluorescência das amostras marcadas pelo TRITC e determinado o percentual de células marcadas.

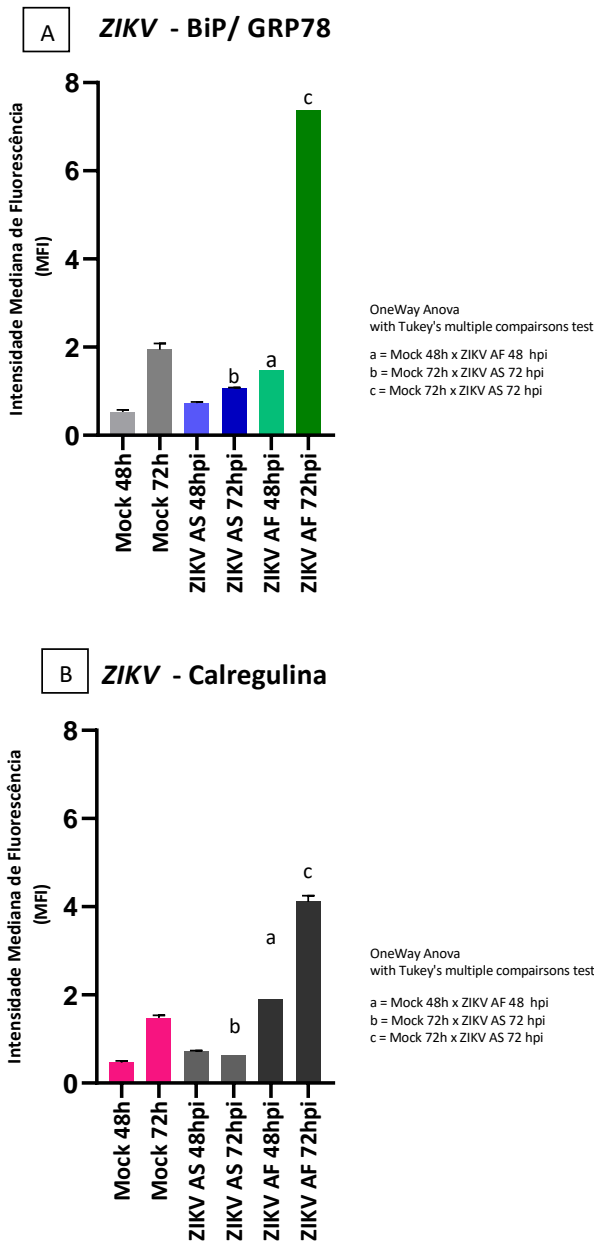
A partir de um controle negativo, ou seja, células não marcadas, determinou-se a *gate* para análise das amostras (Figura 33, painel D). O controle positivo confirmou a marcacão por TRITC dentro da *gate* selecionada (Figura 33, painel E).

A análise dos dados foi feita em programa específico multiplataformas *FlowJo* (FlowJo, LLC) e os resultados foram expressos pela determinacão da Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) (Figura 34).



**Figura 33: Histogramas bivariados de dot plot ilustrando a seleção de gates para determinação da subpopulação de células T98G infectadas por ZIKV AS ou ZIKV AF para marcação das chaperonas BiP e Calregulina.**

Células T98G infectadas com ZIKV AS ou ZIKV AF (MOI 1) foram marcadas com anticorpos específicos para as chaperonas BIP e Calregulina (1:50) e TRITC (1:100). A população de interesse foi identificada pela análise em programa de computador específico multiplataformas (FlowJo) de acordo com parâmetros de altura, granulosidade, largura, marcação de viabilidade celular (7AAD) e co-marcação com anticorpo secundário ligado a fluorocromo (TRITC). Em (A) Estratégia de gate identificando a população de células T98G (91%). Em (B) Estratégia de gate identificando a população de células T98G que se encontravam em singlet/retirada de doublets (95,4%). Em (C) Estratégia de gate para seleção das células viáveis (99,5%). Em (D) Controle negativo para marcação de TRITC. Em (E) Controle positivo para marcação de TRITC. As leituras foram feitas em citômetro de fluxo BD FACSCanto (BD Biosciences) nos canais do PE, para TRITC e PE-Cy-5 para 7AAD.

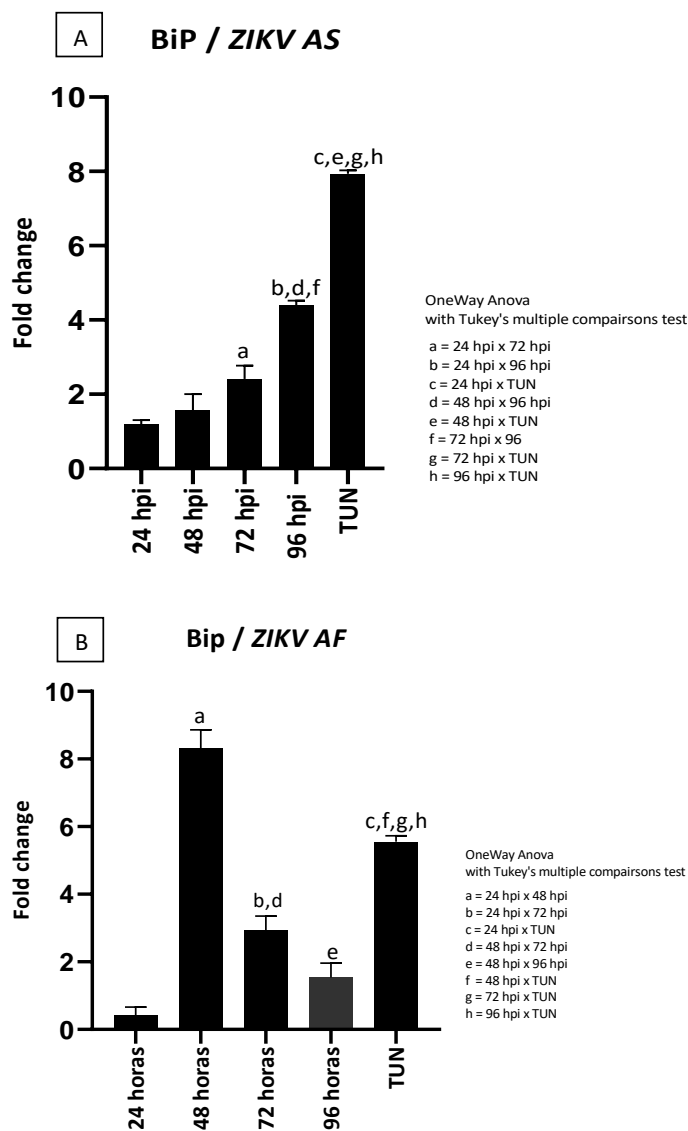


**Figura 34: Expressão proteica das chaperonas BiP e Calregulina, na infecção pelo Zika virus em células T98G.**

O nível de expressão das proteínas BiP e Calregulina foi avaliado em Citometria de fluxo por marcação com anticorpos anti-BiP (A) e anti-Calregulina (B) na presença da infecção pelo Zika vírus da amostra asiática - *ZIKV AS* ou da amostra africana - *ZIKV AF*. Os valores foram expressos pela Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das células infectadas em relação às não infectadas (mock). Os dados representam a média de intensidade de fluorescência em relação a quantidade de vezes que expressou a mais que o mock (células não infectadas). Os dados são médias de duplicatas de um único experimento.

O ensaio mostrou que há regulação positiva da expressão proteica na presença da infecção para ambas as amostras, contudo, verifica-se uma maior expressão proteica, tanto de BiP quanto de Calregulina (Figura 34, painéis A e B), na presença de *ZIKV AF* comparativamente à infecção pelo *ZIKV AS* em células T98G. Além disto, há discrepância entre os perfis temporais de indução da expressão das proteínas entre as duas amostras, diminuindo em 72 horas após a infecção para *ZIKV AS* e aumentando para *ZIKV AF*, em 72 horas após a infecção. Novamente, este resultado tem relação com o comportamento diferente das duas amostras virais em cultivo celular, remetendo há uma infecção crônica da amostra de origem asiática e aguda da amostra africana, com alta replicação em períodos precoces e permitindo o disparo de forma mais abrupta da via UPR em 72 hpi com *ZIKV AF*.

Para avaliar a expressão gênica de BiP, o RNA total de células infectadas com uma MOI de 1 e não infectadas (mock) em tempos após a infecção de 24, 48, 72 e 96 horas, foram analisados por PCR quantitativa (Figura 36).



**Figura 35: Expressão relativa do gene da chaperona BiP/GRP78 na infecção de células T98G pelo vírus Zika.**

Ensaio de qRT-PCR realizado em extrato total de RNA de células T98G infectadas com A) Zika virus da amostra asiática (ZIKAS) ou B) Zika virus da amostra africana (ZIKAF), com iniciadores específicos para BiP. Todos os testes foram realizados em triplicata, com MOI de 1, em tempos de intervalos de infecção de 24, 48, 72 e 96 horas e controle de estresse (tunicamicina) em relação a células não infectadas (*fold change*). Os dados são médias de duplicatas de experimentos independentes.

Em relação a BiP/GRP78, observamos um aumento na expressão do mensageiro desta chaperona, bem como detectado em estudo prévio (GLADWYN-NG *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2018), o início da produção gênica, significativo biologicamente, em 48 horas após

a infecção com *ZIKV AF* e em 72 hpi com *ZIK AS*. Uma vez que a replicação de *ZIK AF* gera título viral mais elevado em menor tempo de infecção, a elevação da carga de BiP também em estágios mais precoces é plausível já que é sabido que BiP é uma das proteínas críticas para a sobrevivência ao estresse do RE, a qual facilita o dobramento e montagem de proteínas, um fator relevante que ajudaria na manutenção da produção de proteínas virais (HENDERSHOT, 2004; LI & LEE, 2006; OTERO *et al.*, 2010). Além disto, estes resultados vão ao encontro aos dados obtidos para ATF6 e IRE1-XBP1. Uma vez inibido o braço ATF6, a expressão de BiP deverá ser comandada por XBP1. XBP1 é um indutor da expressão de BiP, e os achados mostram que a amostra *ZIKV AS* inibe o processamento de XBP1 até 48 hpi, liberando-o mais tarde. Já *ZIKV AF*, apesar dos dados controversos entre as duas técnicas apresentadas, pode não se dedicar tanto assim à inibição de XBP1, já que não detectamos no ensaio de qPCR a modulação negativa do seu processamento em 48hpi. De fato, a expressão de BiP é alta já com 48 hpi, como mostra o resultado da figura 34, no entanto, devido aos achados discrepantes para esta amostra, novos testes devem ser realizados.

*Gladwyn-Ng e colaboradores* (2018), também mostraram que o estresse de RE, na infecção pelo *ZIKV*, com ativação de UPR levou a regulação positiva de algumas chaperonas como a calregulina. A calregulina possui funções de chaperona no lúmen do retículo endoplasmático (ER) sendo importante para a regulação da dobragem de proteínas e da homeostase do cálcio.

#### **6.6 PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA UPR EM CÉLULAS INFECTADAS POR *ZIKV* EM ENSAIO DE MATRIZ DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (*QUANTITATIVE REAL TIME-PCR ARRAY*)**

Uma vez demonstrada a modulação temporal dos três ramos da via UPR, nas células T98G, na infecção pelo Zika virus, analisamos o perfil de expressão de genes relacionados aos braços ATF6, IRE1 e PERK ou mesmo pelo estresse prolongado do RE, de genes relacionados à ativação de apoptose (Anexo 1) para averiguar alterações na expressão gênica da via UPR através da quantificação relativa de genes em amostras infectadas em relação a amostra referência (mock).

Para isto, O RNA total foi transcrito em cDNA e através da reação de PCR em tempo real foi utilizado um arranjo contendo os pares de iniciadores para a amplificação e análise de 84 genes da UPR (*RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array – Human Unfolded Protein Response - Qiagen*). A análise da expressão gênica foi realizada considerando-se como um parâmetro significativo uma diferença de pelo menos duas vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock). Os dados foram normalizados pela média geométrica de 4 genes de expressão constitutiva (Quadro 3) que apresentaram pequenas mudanças em sua expressão nos diferentes grupos de amostras (diferenças nos valores de CT menores que 1).

Partes destes resultados já foram apresentados em seções anteriores, contudo serão novamente apresentados para que o leitor tenha uma visão global do ensaio. Destaca-se que esta parte dos testes foi realizada apenas com a amostra ZIKV AS, como explicitado anteriormente, optamos por utilizar apenas a amostra asiática, uma vez que este ensaio foi desenhado já no final do desenvolvimento do projeto, tendo em vista o contingenciamento de reações. A amostra asiática, no nosso ponto de vista seria prioritária, neste momento, em relação a amostra africana uma vez que a primeira, foi responsável pela epidemia recente e é a amostra de circulação que está associada ao desenvolvimento dos quadros neurológicos graves da SCVZ.

**Quadro 3: Valores de CT e média geométrica dos Genes de expressão constitutiva, utilizados como normalizadores do ensaio de qRT-PCR array, de acordo com o grupo com os grupos estudados de células infectadas (24, 48 e 72 hpi) e não infectadas (Mock).**

Groups	Samples	ACTB	GAPDH	HPRT1	RPLP0	Geometric Mean	Average Geometric Mean
Control Group	MOCK	17.1274	17.3197	24.7324	21.0575	19.83	19.83
Group 1	24H	17.0135	17.1963	24.3021	21.1295	19.69	19.69
Group 2	48H	17.0135	17.1963	24.3021	21.1295	19.69	19.69
Group 3	72H	17.4295	18.1846	24.6759	21.518	20.25	20.25

A regulação biologicamente significativa apresentam valores de *Fold change* maiores que um e indicam uma regulação positiva ou uma regulação de subida. Valores de *Fold change* menores que um indicam uma regulação negativa. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não

infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. Na tabela 2 são apresentados os valores de *Fold regulation* obtidos para cada grupo (24, 48 e 72 hpi) em relação ao Mock. Na tabela abaixo, os valores de *Fold regulation* maiores que 2 são indicados em cinza e valores menores que -2 estão indicados em azul.

**Tabela 2: Análise da expressão gênica em células T98G infectadas com ZIKV AS**

Símbolo do gene	Up-Down Regulation (comparação ao grupo controle)		
	24 hpi	48 hpi	72 hpi
AMFR	-2,2409	1,1058	2,7979
ATF4	-2,5742	1,0724	3,2742
ATF6	-1,4743	1,2288	4,0299
ATF6B	-1,4835	-1,1848	1,591
ATXN3	-1,0052	1,5687	4,1859
BAX	-1,1005	-1,1005	1,346
CALR	-2,1784	1,0718	2,3117
CANX	-1,3653	1,0177	2,7373
CCT4	-1,463	-1,0114	2,1028
CCT7	-2,045	1,6263	5,0586
CEBPB	-1,0726	1,3676	2,8603
CREB3	-1,8346	-1,8346	1,2868
CREB3L3	-1,4459	1,3302	3,4303
DDIT3	-1,0837	1,1749	4,7527
DERL1	-1,0019	1,128	4,0901
DERL2	-1,9264	1,0832	3,7186
DNAJB2	-1,4254	-1,0276	2,3505
DNAJB9	-1,868	1,1577	3,0847
DNAJC10	1,0007	1,604	5,9391
DNAJC3	-3,8315	1,4854	1,6559
DNAJC4	-1,4958	1,4313	3,8492
EDEM1	-1,9244	-1,0867	4,7143
EDEM3	-1,2575	1,1079	3,2584
EIF2A	-3,0674	1,0476	2,6728
EIF2AK3	-2,1441	1,0465	2,802
ERN1	-2,8731	-1,1723	1,9341
ERN2	-1,3724	1,1293	2,272
ERO1A	3,5532	-1,1005	5,203
ERO1B	-1,3667	1,0698	2,4532
ERP44	1,2793	1,1919	2,3178
FBXO6	-1,9929	1,4828	2,0614
GANAB	1,0757	1,0792	1,8978
GANC	-1,7362	-1,0933	2,6376
HERPUD1	-1,9343	-1,3421	1,3958

HSPA1B	-1,0013	1,2663	4,9456
HSPA1L	-1,3891	1,4318	5,6067
HSPA2	-1,2155	-1,0647	3,3754
HSPA4	-1,7605	1,1305	3,0845
HSPA4L	-1,7391	1,0204	3,2491
HSPA5	-1,5989	1,1017	3,4729
HSPH1	-1,8689	1,0667	2,7193
HTRA2	-2,3935	1,0058	2,5458
HTRA4	-1,84	1,2229	2,3783
INSIG1	-1,6752	1,18	1,6343
INSIG2	-1,5566	-1,0024	1,8082
MANF	-2,3251	-1,2623	-1,8366
MAPK10	1,9388	1,9368	9,6374
MAPK8	1,2789	1,071	3,3025
MAPK9	-1,0335	-1,0693	2,1958
MBTPS1	1,5519	1,2118	3,4294
MBTPS2	1,3281	-1,554	1,6175
NPLOC4	1,6229	1,0439	3,6949
NUCB1	1,8455	1,028	4,026
OS9	1,7691	1,1245	3,973
PDIA3	1,9506	1,3976	5,2683
PFDN2	1,2793	-1,0793	4,1334
PFDN5	1,701	1,0354	4,1625
PPIA	1,85	1,3294	2,612
PPP1R15A	1,365	1,2727	4,1911
PRKCSH	2,0405	1,0901	2,9417
RNF139	1,6853	1,1585	2,7116
RNF5	2,5001	1,4814	5,3371
RPN1	1,9181	1,0469	3,3998
SCAP	1,8178	-1,0568	1,5934
SEC62	1,4756	1,0394	2,2211
SEC63	1,4464	1,0356	2,2906
SEL1L	2,3584	-1,0386	1,157
VIMP	1,1733	1,4494	2,5724
SERP1	-1,0202	-3,6245	1,1807
SIL1	-1,0319	1,5181	4,2792
SREBF1	1,0315	-1,1244	1,3157
SREBF2	1,7734	2,8917	6,6596
SYVN1	1,1826	2,0039	1,5825
TCP1	1,2532	1,0165	-1,0401
TOR1A	1,3339	1,1121	2,4428
UBE2G2	2,0157	4,1696	13,523
UBE2J2	1,4908	-1,639	-1,0316
UBXN4	1,4014	1,1093	1,0002
UFD1L	-1,7514	1,1611	1,1025
UGGT1	-1,0843	1,4655	1,297

UGGT2	-1,1005	1,877	1,346
USP14	1,5166	2,9866	4,491
VCP	1,1465	1,1186	1,0772
XBP1	1,4638	1,4703	-1,0497

Dos 84 genes avaliados - nas células infectadas por 24, 48 e 72 horas - 5 (5,95%), 3 (3,57%) e 60 (71,43%) genes, foram induzidos, respectivamente. Já a inibição ocorreu em 10 (11,9%) genes em 24 hpi e em 1 (1,19%) gene em 48 hpi. Em 72 hpi não houve inibição da expressão gênica entre os marcadores avaliados.

Em 24 horas, os cinco genes que tiveram a expressão aumentada em relação ao controle de células não infectado (Mock) foram: ERO1A (3,55) que codifica uma proteína oxidase relacionada à catálise da formação e isomerização de ligações dissulfeto de proteínas no retículo endoplasmático; PRKCSH (2,04) uma proteína, substrato da proteína quinase C, com função de glicosilação no retículo endoplasmático; RNF5 (2,50) uma ligase de ubiquitina; SEL1L (2,36) que faz parte de um complexo proteico envolvido na translocação de proteínas não dobradas do lúmen do retículo endoplasmático para o citosol, onde serão degradadas pelo proteassoma e UBE2G2 (2,02) membro da família de enzimas de conjugação de ubiquitina, albergando um importante mecanismo celular para o direcionamento de proteínas para degradação.

Nesta mesma condição 10 genes foram inibidos: alguns genes do braço PERK (EIF2AK3 / PERK e ATF4), o gene de expressão de IRE1 $\alpha$  (ERN1), um fator de iniciação de tradução eucariótica (EIF2A), proteínas de choque térmico ou relacionadas ao dobramento (CALR, CCT7, DNAJC3) degradação ou apoptose (AMFR, HTRA2 e MANF). Estes dados corroboram os resultados obtidos pelas análises isoladas que mostram a não ativação dos braços IRE1 e PERK em estágios mais precoces da infecção. O restante dos genes avaliados não apresentou alteração significativa na carga gênica em relação ao controle não infectado.

**Tabela 3: Relação dos genes que tiveram expressão aumentada (à esquerda) ou diminuída (à direita) em células T98G infectadas com ZIKV AS em 24 horas após a infecção.**

<b>Genes <i>Over-Expressed</i> no Grupo 24 hpi vs. Mock</b>		<b>Genes <i>Under-Expressed</i> no Grupo 24 hpi vs. Mock</b>	
<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold change</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold change</b>
ERO1A	3.55	AMFR	-2,2409
RNF5	2.50	ATF4	-2,5742
SEL1L	2.36	CALR	-2,1784
PRKCSH	2.04	CCT7	-2,045
UBE2G2	2.02	DNAJC3	-3,8315
		EIF2A	-3,0674
		EIF2AK3	-2,1441
		ERN1	-2,8731
		HTRA2	-2,3935
		MANF	-2,3251

Em 48 horas, foram induzidos os genes codificantes de SREBF2 (2,89) que controla a homeostase do colesterol, um componente de membrana; UBE2G2 (4,17) enzima conjugadora da ubiquitina; USP14 (2,99) um gene codifica um membro da família de proteases de processamento específico da ubiquitina, possui função deubiquitinante, tendo portanto um papel importante na regulação da degradação de proteínas por promover a desconjugação da ubiquitina de proteínas ubiquitiniladas. Apenas um gene teve sua expressão inibida, o SERP1, cuja proteína atua como regulador de tradução e promove a regulação da resposta ao estresse de RE. Os demais genes avaliados não tiveram alteração significativa na carga gênica em relação ao controle não infectado.

**Tabela 4: Relação dos genes que tiveram expressão aumentada (à esquerda) ou diminuída (à direita) em células T98G infectadas com ZIKV AS em 48 horas após a infecção**

<b>Genes <i>Over-Expressed</i> no Grupo 48 hpi vs. Mock</b>		<b>Genes <i>Under-Expressed</i> no Grupo 48 hpi vs. Mock</b>	
<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold change</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold change</b>
UBE2G2	4.17	SERP1	-3,6245
USP14	2.99		
SREBF2	2.89		

Em 72 horas, foram induzidos 60 genes, o que revela maior ativação da via UPR neste tempo após a infecção, quando comparado a 24 e 48 horas após a infecção das células

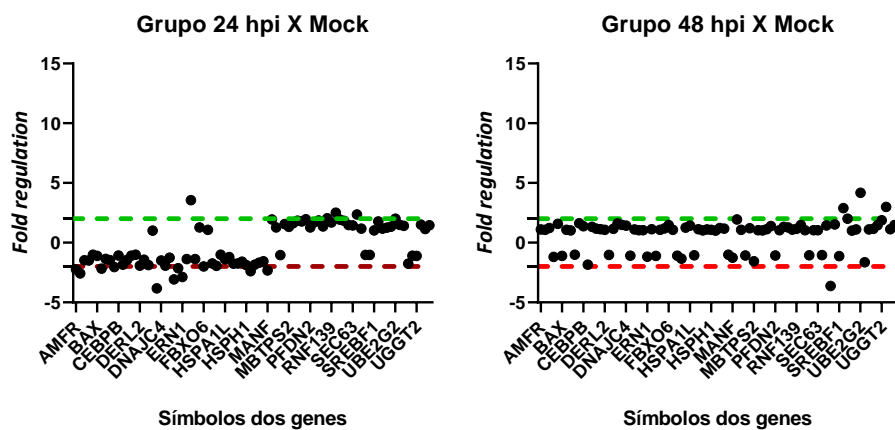
T98G com o ZIKV AS. Em suma, na infecção mais tardia há uma ativação geral da expressão de genes de componentes da via associados ao dobramento, tais como proteínas do choque térmico (HSPA, DNAJ); ubiquitinação (UBE2G2, RNF5, EDEM3 e AMFR); degradação associada ao retículo (EDEM1, DERL1, NUCB1, NPLOC4, USP14, MBTPS1) e apoptose (MAPK10, DDIT3 ou CHOP e HSPA1B). Sendo que os de maiores expressão foram: UBE2G2 (13,52) relacionado à ubiquitinação, MAPK10 (9,64) que codifica uma proteína denominada proteína cinase 10 ativada por mitógeno ou c-Jun quinase N-terminal 3 (JNK3) trata-se de um membro da família da quinase MAP com funções reguladoras nas vias de sinalização durante a apoptose; SREBF2 (6,66), DNAJC10 (5,94) um membro da família de proteínas de choque térmico (Hsp40) que codifica uma co-chaperona que atua no complexo de degradação associado ao retículo endoplasmático (ERAD), possui a função de reconhecer e degradar proteínas não enoveladas; entre outros. Já um total de 24 genes não apresentou mudança significativa na expressão gênica nas células infectadas em 72 hpi em relação ao controle não infectado.

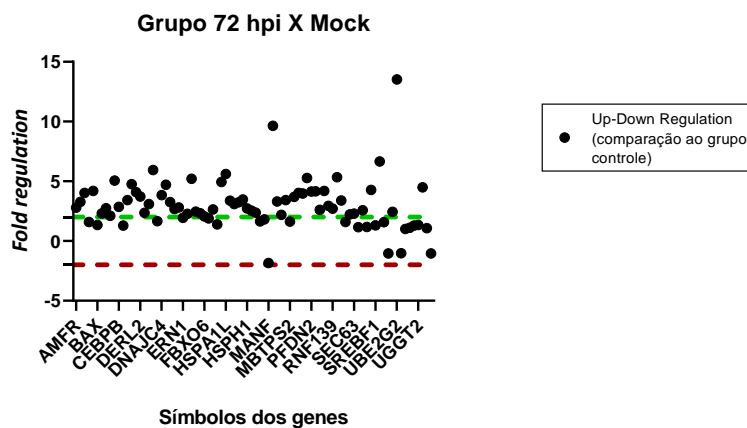
**Tabela 5: Relação dos genes que tiveram expressão aumentada (à esquerda) ou diminuída (à direita) em células T98G infectadas com ZIKV AS em 72 horas após a infecção.**

<b>Genes Over-Expressed no Grupo 72 hpi vs. Mock</b>			
<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold change</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Fold change</b>
UBE2G2	13.52	MAPK8	3.30
MAPK10	9.64	ATF4	3.27
SREBF2	6.66	EDEM3	3.26
DNAJC10	5.94	HSPA4L	3.25
HSPA1L	5.61	DNAJB9	3.08
RNF5	5.34	HSPA4	3.08
PDIA3	5.27	PRKCSH	2.94
ERO1A	5.20	CEBPB	2.86
CCT7	5.06	EIF2AK3	2.80
HSPA1B	4.95	AMFR	2.80
DDIT3	4.75	CANX	2.74
EDEM1	4.71	HSPH1	2.72
USP14	4.49	RNF139	2.71
SIL1	4.28	EIF2A	2.67
PPP1R15A	4.19	GANC	2.64
ATXN3	4.19	PPIA	2.61
PFDN5	4.16	VIMP	2.57
PFDN2	4.13	HTRA2	2.55
DERL1	4.09	ERO1B	2.45

ATF6	4.03	TOR1A	2.44
NUCB1	4.03	HTRA4	2.38
OS9	3.97	DNAJB2	2.35
DNAJC4	3.85	ERP44	2.32
DERL2	3.72	CALR	2.31
NPLOC4	3.69	SEC63	2.29
HSPA5	3.47	ERN2	2.27
CREB3L3	3.43	SEC62	2.22
MBTPS1	3.43	MAPK9	2.20
RPN1	3.40	CCT4	2.10
HSPA2	3.38	FBXO6	2.06

A visualização geral da expressão gênica nos tempos 24, 48 e 72 hpi em gráficos de dispersão (Figura 36) mostra a distribuição de todos os genes avaliados e permite a comparação da expressão normalizada de cada gene entre os grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação ao não infectado (*Mock*) e possibilita visualizar rapidamente grandes mudanças de expressão gênica. As linhas pontilhadas indicam o limite de regulação da dobra selecionada. Pontos de dados localizados acima das linhas verdes pontilhadas indicam aumento da expressão do gene correspondente (*Up-regulation*) e pontos abaixo das linhas verdes pontilhadas indicam diminuição da expressão do gene correspondente. Aqueles localizados na região intermediária as duas linhas não apresentaram mudança significativa na expressão gênica.



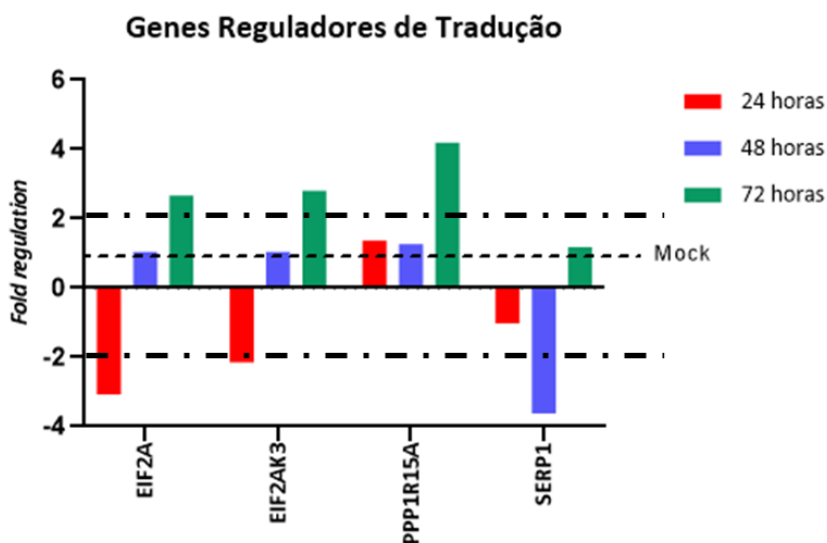


**Figura 36: Expressão de genes da via UPR em células T98G infectadas pelo ZIKV AS em relação ao controle de células não infectadas.**

Nos gráficos acima estão plotados os genes induzidos (representados pelos pontos acima da linha verde, ou seja, com valores de *Fold regulation* acima de 2) ou inibidos (representados pelos pontos abaixo da linha vermelha, ou seja, com *Fold regulation* abaixo de -2) após a infecção pelo ZIKV AS de acordo com o tempo após a infecção (24, 48 e 72 hpi). Dos 84 genes avaliados em ensaio de arranjo (*RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array – PAHS-089Z - Qiagen*). - nas células infectadas por 24, 48 e 72 horas – 5, 3 e 60 genes, foram induzidos, respectivamente. Os genes induzidos estão posicionados acima da linha tracejada verde indicada nos gráficos. Já a inibição ocorreu em 10 genes em 24 hpi e em 1 gene em 48 hpi, os valores correspondentes aos genes inibidos encontram-se abaixo da linha vermelha tracejada indicada nos gráficos. Em 72 hpi não houve inibição da expressão gênica entre os marcadores avaliados.

Mais uma vez, isso confirma os dados das análises isoladas dos braços da UPR, que mostraram modulação dos sensores IRE1 e PERK em pelo menos até 48hpi e ativação após 72 hpi e inibição de ATF6 em até 72hpi para a amostra asiática.

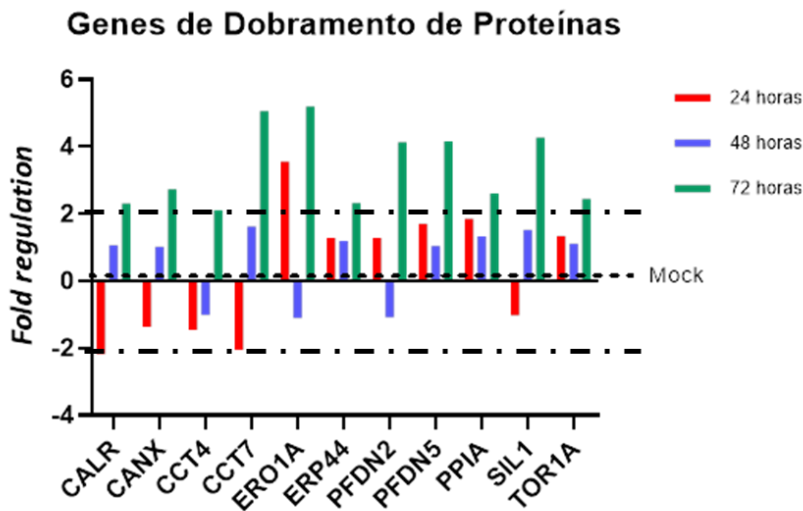
Considerando o agrupamento funcional de cada gene da UPR informado no arranjo da *Qiagen*, dentre os genes analisados, dos que apresentaram mudança significativa na expressão gênica nas células infectadas destacam-se: os genes envolvidos na regulação da tradução (Figura 37), PPP1R15A (GADD34), EIF2AK3 (PERK) e EIF2A que tiveram aumento de 4,1911; 2,802 2,6728 vezes, respectivamente, com elevação significativa apenas em 72 horas de infecção. Em contrapartida os genes envolvidos na regulação da tradução EIF2AK3 (PERK) e EIF2A tiveram sua expressão inibida em 24 horas após infecção, já SERP1 foi inibido em 24 e 48 horas após infecção. Este quadro sugere que, de forma geral, a tradução global de proteínas pode não estar sendo regulada pela inibição da tradução promovida pela via de PERK, no início da infecção, fato que pode está ocorrendo em fase mais avançada da infecção pelo ZIKV AS, após 72 hpi.



**Figura 37: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes reguladores da tradução.**

Avaliação da expressão de genes relacionados à regulação da tradução em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. Os dados mostram que o conjunto de genes reguladores de tradução está aumentado em fase tardia da infecção, em 72 hpi. Destaca-se SERP1 que mostrou inibição em 48 hpi. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

Entre os genes associados ao dobramento de proteínas durante o estresse do retículo endoplasmático que estão representados no gráfico da figura 38, todos foram induzidos em 72 horas após a infecção, entre eles os dois de maiores expressões foram CCT7 e ERO1A, com aumento de 5,0586 e 5,203 vezes em relação ao controle de células não infectadas. Em destaque o gene que codifica ERO1A (ou ERO1L) apresentou um perfil específico de aumento de expressão gênica em 24 hpi (de 3,5532 vezes), seguido de queda em 48 hpi e subsequente elevação da expressão em 72 hpi (de 5,203 vezes). Este gene codifica uma oxidase residente no retículo endoplasmático com um papel na formação de pontes dissulfeto, capaz de regular a maturação oxidativa de proteínas secretoras e membranares no retículo endoplasmático (ER).

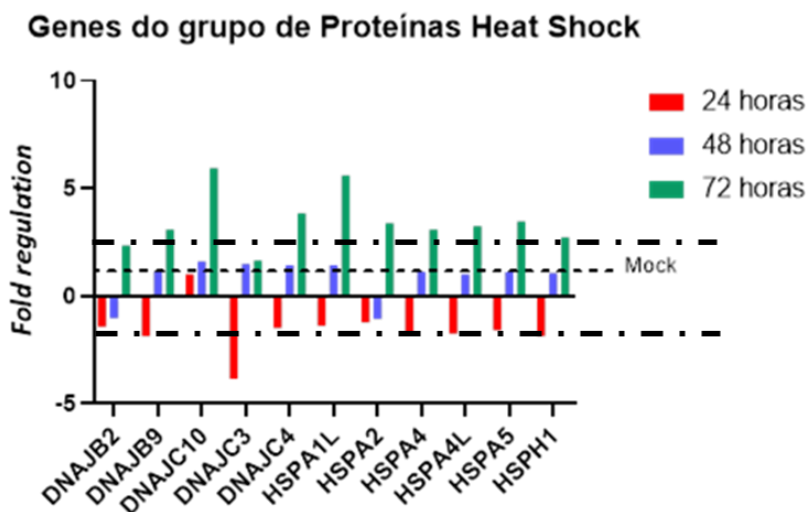


**Figura 38: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes de dobramento de proteínas.**

Avaliação da expressão de genes relacionados à regulação da tradução em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. Os dados mostram que o conjunto de genes relacionados ao dobramento de proteínas tem aumento de expressão em fase tardia da infecção, em 72 hpi. Destaca-se ERO1A e PFDN2 que tiveram inibição em 48 hpi. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

Além destes, vários genes envolvidos no controle de qualidade de dobramento de proteínas, ligantes a proteínas não dobradas, proteínas de isomerização dissulfídica e regulação do metabolismo do colesterol também tiveram um aumento significativo de expressão. Os genes que codificam as proteínas *Heat Shock* (DNAJB2, DNAJB9, DNAJC10, DNAJC4, HSPA1L, HSPA2, HSPA4, HSPA4L, HSPA5 e HSPH1), representados na Figura 39, foram induzidos apenas em 72 hpi, em níveis significativos entre 2,4 e 5,9 vezes. Não obstante, o gene referente a proteína de choque térmico DNAJC3 (p58IPK), um produto da via de ATF6 que atua como inibidor do braço PERK, teve sua expressão inibida em fase mais precoce da infecção (24 hpi), mantendo-se em níveis equivalente ao mock nos tempos 48 e 72 hpi. A análise isolada da verificação da expressão gênica da chaperona BiP (HSPA5) replicou o apresentado no ensaio de matriz que mostrou

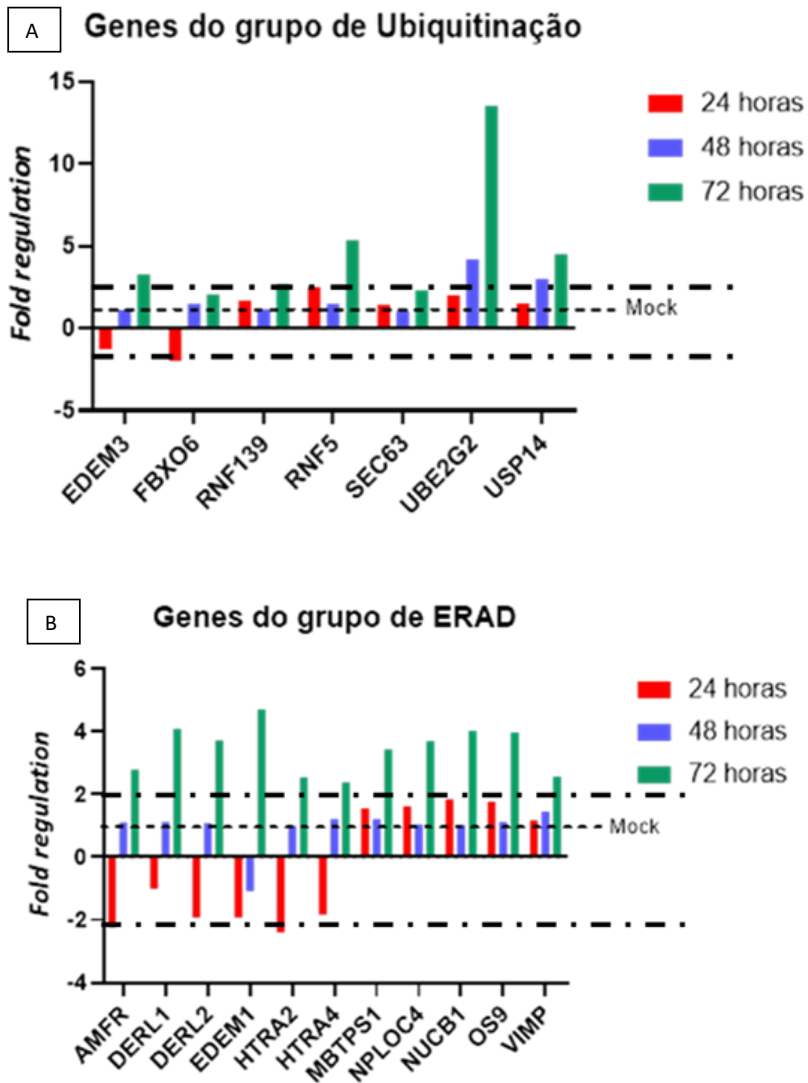
aumento em 72 hpi. Os testes de marcação das proteínas BiP e Calregulina (CALR) mostraram presença da proteína em 48 hpi e aumento em 72hpi.



**Figura 39: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes de Proteínas Heat Shock.**

Avaliação da expressão de genes relacionados à regulação da tradução em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. Os dados mostram que o conjunto de genes de proteínas do choque térmico tem aumento de expressão em fase tardia da infecção, em 72 hpi. Destaca-se DNAJ3 que teve inibição em 24 hpi. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

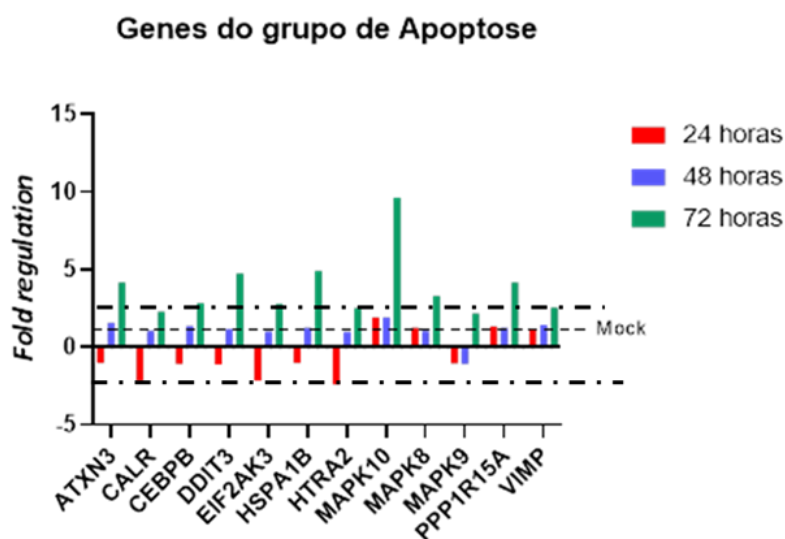
Os genes para ubiquitinação (Figura 40, painel A) EDEM3, FBXO6, RNF139, RNF5, SEC63, UBE2G2 e USP14 foram induzidos (entre 2,2906 e 13,523) apenas 72 hpi, bem como vários genes envolvidos na degradação do RE (ERAD): AMFR, DERL1, DERL2, EDEM1, HTRA2, HTRA4, MBTPS1, NPLOC4, NUCB1, OS9 (entre 2,0614 a 4,7143). Alguns genes tiveram a expressão inibida em 24 hpi como AMFR (-2,2409) e HTRA2 (-2,3935). Vários genes de ativação do ERAD (Figura 40, painel B), entre eles os que foram mais expressos foram NPLOC4, DERL2, OS9, NUCB1, DERL1, EDEM1, em torno de 4 vezes; e HTRA4 HTRA2 VIMP AMFR MBTPS1, encontram-se elevados entre 3 e 2 vezes, em 72 hpi. Em destaque, EDEM1, que teve sua expressão inibida em 48hpi.



**Figura 40: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes de Ubiquitinação e genes do grupo de degradação associado ao retículo (ERAD).**

Avaliação da expressão de genes relacionados à indução da ubiquitinação e de disparo de ERAD em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. Os dados mostram que o conjunto de genes relacionados a ubiquitinação e ERAD tem aumento de expressão em fase tardia da infecção, em 72 hpi. Destaca-se que alguns genes do ERAD tiveram inibição no início da. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

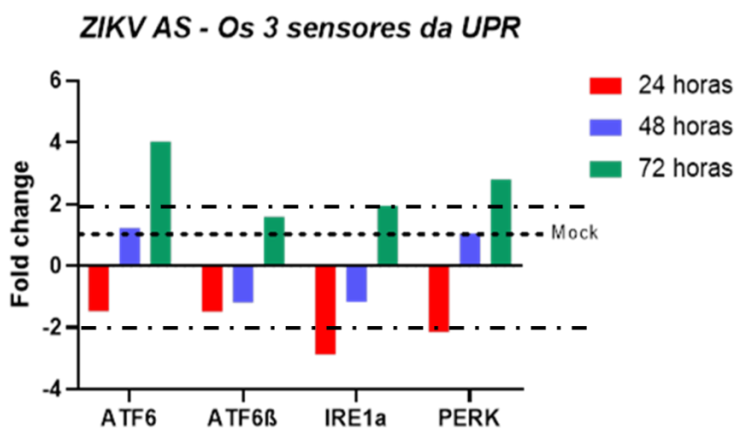
Vários genes envolvidos no disparo das vias de apoptose (Figura 41), analisados no ensaio de arranjo, apresentaram mudança significativa na expressão gênica nas células infectadas em 72 hpi: ATXN3, CALR, CEBPB, DDIT3, EIF2AK3, HSPA1B, HTRA2, MAPK10, MAPK8, MAPK9, PPP1R15A, VIMP, variando entre 2,2 e 9,6 vezes em relação ao controle de células não infectadas. A maior indução foi observada para MAPK10 (JNK3) uma proteína do grupo das proteínas quinases ativadas por mitógenos que desempenha funções reguladoras nas vias de sinalização durante a apoptose neuronal em resposta ao estresse. Dentre estes, 3 genes relacionados com apoptose apresentaram inibição da expressão gênica CALR (-2,1784), EIF2AK3 (-2,1441) e HTRA2 (-2,3935).



**Figura 41: Expressão de genes da UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS, de acordo com o seu enquadramento em grupos de Genes grupo de Apoptose.**

Avaliação da expressão de genes relacionados à apoptose em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. Os dados mostram que o conjunto de genes relacionados a apoptose tem aumento de expressão em fase tardia da infecção, em 72 hpi. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

Em relação aos sensores que coordenam a resposta a proteína desdobrada (UPR), ATF6 e PERK (EIFAK3) tiveram a sua transcrição gênica aumentada, 4,0299 e 2,802 vezes de indução, respectivamente, apenas em 72 hpi; enquanto o sensor IRE1 $\alpha$  (ERN1) não demonstrou aumento significativo (1,9341) mesmo em 72hpi (Figura 42).



**Figura 42: Expressão de genes dos três sensores da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS.**

Avaliação da gênica dos genes dos três sensores da via UPR em células T98G infectadas por ZIKV AS (MOI 1) em ensaio de arranjo RT-qPCR. Os dados mostram que os três sensores não tiveram aumento na expressão de seu gene em fase inicial de infecção, ou seja, até 48 hpi. Já ATF6 (4,0299) e PERK (2,802) têm aumento do seu mensageiro em 72 hpi. Destaca-se ainda que IRE1 (-2,8731) e PERK (-2,1441) têm sua expressão inibida em 24 hpi. Os valores de *Fold regulation* estão representados no gráfico e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está mais expresso que o controle, indicando uma regulação positiva do gene; ou menos expresso que o controle, indicando uma regulação negativa do gene. Foram considerados como um parâmetro significativo de indução, uma diferença de pelo menos 2 vezes da expressão gênica dos grupos infectados (24, 48 e 72 hpi) em relação aos controles não infectados (mock) e para inibição valores menores que -2. A linha tracejada corresponde aos valores do Mock, normalizado para 1; em vermelho a linha correspondente aos valores de 24 hpi; em azul 48 hpi e em preto 72 hpi para cada gene.

Estes resultados sugerem que a via UPR é ativada em células T98G durante a infecção pelo ZIKV AS em 72 hpi, tempo no qual a expressão de quase todos os 84 genes da via de resposta ao estresse do retículo avaliados está aumentada em relação ao controle de células não infectadas. Além disso, é possível detectar a inibição de forma significativa de alguns genes em 24 hpi e uma correlação mais aproximada com o Mock do tempo de 48 hpi.

Em suma, observamos que a infecção pelo ZIKV ativou as vias IRE1-XBP1 PERK, ao contrário de ATF6, na linhagem celular de neuroblastoma humano. Os caminhos de execução da UPR são diferentes para regular o estresse do RE, podendo seguir para

vias pró-sobrevivência ou pró-apoptóticas, o que pode ser definido pela intensidade e tempo de duração da resposta. Portanto, quando avaliamos os efeitos de cada caminho, concluímos que há uma regulação negativa na UPR em estágios precoces da infecção pelo ZIKV, o que pode contribuir para a extensão da sobrevivência celular e assim garantir a eficiência da replicação viral. Esses resultados demonstraram que a infecção pelo ZIKV ativou o estresse do RE e regulou a UPR em células neuronais, no entanto, maiores elucidaciones sobre interação entre a replicação viral e a resposta ao estresse celular ainda são necessárias para revelar completamente a interação dos componentes virais com os fatores do hospedeiro e indicar novos caminhos para o tratamento e maiores elucidaciones sobre a patologia da infecção pelo ZIKV.

## 7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Alguns entraves no desenvolvimento deste projeto, como disponibilidade de recursos e ferramentas, levam a algumas limitações que podem ser apontadas e servem como direções para proposições para a continuidade deste estudo em projetos futuros. O modelo de escolha inicial abordava Fibroblastos de embrião de camundongo, que incluía células desprovidas de ATF6 e PERK, ferramentas importantes para avaliar a importância destas vias na replicação viral. Entretanto, o modelo de infecção não foi permissivo à multiplicação viral e teve que ser trocado, o que limitou a obtenção da resposta da infecção por ZIKV na ausência destes braços da UPR. Como proposição, sugere-se avaliar a infecção em outros modelos nocautes ou mesmo utilizar drogas com função inibitória de pontos importantes da via. Além disto, após a avaliação em modelo celular propõe-se sequencialmente o estudo em modelo *in vivo*, que abrangeria de forma mais próxima a realidade, para amplificar as respostas obtidas. Cabe considerar que apesar dos resultados por técnicas diferentes corroborarem entre si, em alguns ensaios não foram feitas réplicas biológicas, foram realizadas apenas réplicas experimentais, o que pode ser um vies deste estudo. Além disto, o estudo com a amostra de origem africana não foi possível ser feito para todas as técnicas, por questões de contingenciamento de reações, conforme relatado anteriormente, o que impossibilitou a comparação entre as duas amostras, de origem asiática e origem africana, em alguns pontos do estudo. Para avaliar de forma mais aprofundada a ativação das vias de UPR sugere-se avaliar num maior contexto a expressão de proteínas que pode ser feito pela quantificação de forma pontual em técnicas de Citometria de fluxo ou Western blot, ou por proteômica, com maior espectro. Isto também pode ser apontado como uma limitação, uma vez que foi investigada, em sua maior parte, a expressão gênica de alvos importantes da via UPR, que mostra o comportamento do início da ativação da via, mas que deixa uma lacuna em relação ao próximo passo, sobre a ocorrência da tradução destas moléculas.

Ainda, após explicitar quais estratégias o vírus utiliza para manter sua replicação nas células e quais vias são essenciais para que ela ocorra, o estudo pode ser direcionado para uma abrangência terapêutica que ajude no tratamento e contenção da infecção que impeça a evolução para os quadros neurológicos graves associados ao Zika virus.

## 8 CONCLUSÕES

- O modelo celular em neuroblastoma T98G corrobora estudos que mostram diferenças entre a virulência apresentada pelas duas amostras avaliadas, sendo que a amostra africana apresentou maior título viral e citopatogenia em tempos mais precoces em relação a amostra asiática. Além disto, é possível concluir que este modelo pode ser utilizado para avaliar o comportamento do ZIKV na modulação da via UPR., uma vez que as células são permissivas ao vírus e à infecção.
- Ambas amostras de ZIKV estudadas, *ZIKV AS* e *ZIKV AF*, ativam, de uma forma geral, a via UPR, principalmente nas fases mais tardias da infecção.
- O braço ATF6 da via UPR não é ativado na infecção pelas amostras asiática e africana, o que sugere modulação negativa durante a infecção.
- *ZIKV AS* e *ZIKV AF* parecem inibir a via IRE1-XBP1 nos momentos precoces da infecção, por meio da inibição do processamento de XBP1.
- Tanto *ZIKV AS* como *ZIKV AF* modularam a ativação de PERK-ATF4 para ativação em fases tardias da infecção, equanto a expressão gênica de CHOP é modulada negativamente no início da infecção com a amostra asiática, a amostra africana já induz altos níveis desta molécula.
- De forma geral, o *ZIKV AS* inibe a ativação de UPR em até 48hpi e a ativa de forma contundente após 72hpi. A amostra africana parece estabelecer um perfil de ativação mais precoce, no entanto, devido à limitação de testes com esta amostra, ainda necessita confirmação experimental.

ANEXO 1

PCR Array Catalog #:	PAHS-089Z							
Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname	RT2 Catalog		
A01	Hs.295137	NM_011144	AMFR	Autocrine motility factor receptor	GP78/RNF45	PPH16329A		
A02	Hs.496487	NM_001675	ATF4	Activating transcription factor 4 (tax-respon	CREB-2/CREB2/TAX	PPH02016A		
A03	Hs.492740	NM_007348	ATF6	Activating transcription factor 6	ATF6A	PPH20143A		
A04	Hs.42853	NM_004381	ATF6B	Activating transcription factor 6 beta	CREB-RP/CREBL1	PPH09189B		
A05	Hs.532632	NM_004993	ATXN3	Ataxin 3	AT3/ATX3/JOS/MJD	PPH19855B		
A06	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	BCL2L4	PPH00078B		
A07	Hs.515162	NM_004343	CALR	Calreticulin	CRT/HEL-S-99n/R0	PPH02060A		
A08	Hs.567968	NM_001746	CANX	Calnexin	CNX/IP90/P90	PPH05937F		
A09	Hs.421509	NM_006430	CCT4	Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (de	CCT-DELTA/Cctd/SF	PPH05931A		
A10	Hs.368149	NM_006429	CCT7	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (et	CCTETA/CCTH/NIP7	PPH05934F		
A11	Hs.517106	NM_005194	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)	C/EBP-beta/IL6/DBP	PPH00991A		
A12	Hs.522110	NM_006368	CREB3	CAMP responsive element binding protein	LUMAN/LZIP/sLZIP	PPH16113A		
B01	Hs.247744	NM_032607	CREB3L3	CAMP responsive element binding protein	CREB-H/CREBHHY	PPH14959A		
B02	Hs.505777	NM_040803	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	CEBPZ/CHOP/CHO	PPH00310A		
B03	Hs.241576	NM_024295	DERL1	Der1-like domain family, member 1	DER-1/DER1	PPH14876A		
B04	Hs.730726	NM_018041	DERL2	Der1-like domain family, member 2	CGI-101/DERtrin-2/F	PPH16034A		
B05	Hs.77768	NM_006736	DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, mem	CMT21/D5MA5/H5J	PPH01203F		
B06	Hs.732494	NM_023238	DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, mem	ERdj4/MDJ-5/MDJ5	PPH05919A		
B07	Hs.516832	NM_018981	DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, mem	ERdj5/JPD1/MT/H/PC	PPH07048A		
B08	Hs.59214	NM_006260	DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, mem	ACPHD/ERdj6/HF58	PPH07375A		
B09	Hs.172847	NM_005528	DNAJC4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, mem	DANJC4/HSPF2/MC	PPH01210C		
B10	Hs.224616	NM_014674	EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase al	EDEM	PPH12935B		
B11	Hs.523811	NM_025191	EDEM3	ER degradation enhancer, mannosidase al	C1orf22	PPH16713A		
B12	Hs.655782	NM_030225	EIF2A	Eukaryotic translation initiation factor 2A, e	CDAA02/EIF-2A/MST0	PPH18488A		
C01	Hs.591589	NM_004836	EIF2AK3	Eukaryotic translation initiation factor 2- $\alpha$	PEK/PERK/WRS	PPH10874A		
C02	Hs.133982	NM_001433	ERN1	Endoplasmic reticulum to nucleus signalin	IRE1/IRE1P/IRE1a/h	PPH12383C		
C03	Hs.592041	NM_033266	ERN2	Endoplasmic reticulum to nucleus signalin	IRE1-BETA/IRE1b/R	PPH23909A		
C04	Hs.525339	NM_014584	ERO1A	ERO1-like (S. cerevisiae)	ERO1-L/ERO1-L- $\alpha$	PPH07766A		
C05	Hs.558519	NM_019891	ERO1B	ERO1-like beta (S. cerevisiae)	ERO1LB/ERO1beta	PPH19972A		
C06	Hs.154023	NM_015051	ERP44	Endoplasmic reticulum protein 44	PDIA10/TXNDC4	PPH12912A		
C07	Hs.464419	NM_018438	FBXO6	F-box protein 6	FBG2/FBS2/FBX6/F	PPH15979A		
C08	Hs.595071	NM_198334	GANAB	Glucosidase, alpha; neutral AB	G2AN/GLUII	PPH10034A		
C09	Hs.730906	NM_198141	GANC	Glucosidase, alpha; neutral C	-	PPH23951B		
C10	Hs.146393	NM_014685	HERPUD1	Homocysteine-inducible, endoplasmic retic	HERP/MI1/SUP	PPH12606A		
C11	Hs.274402	NM_005346	HSPA1B	Heat shock 70kDa protein 1B	HSP70-1B/HSP70-2/	PPH01216B		
C12	Hs.690634	NM_005527	HSPA1L	Heat shock 70kDa protein 1-like	HSP70-1L/HSP70-H	PPH01206F		
D01	Hs.432648	NM_021979	HSPA2	Heat shock 70kDa protein 2	HSP70-2/HSP70-3	PPH01202F		
D02	Hs.90293	NM_002154	HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4	APG-2/HEL-3-5a/HS	PPH01189C		
D03	Hs.135554	NM_014278	HSPA4L	Heat shock 70kDa protein 4-like	APG-1/HSPH3/Osp9	PPH01200A		
D04	Hs.743241	NM_005347	HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regul	BIP/GRP78/HEL-S-8	PPH00158E		
D05	Hs.743267	NM_006644	HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSP105/HSP105A/H	PPH01196F		
D06	Hs.469045	NM_013247	HTRA2	HtrA serine peptidase 2	OM/PARK13/PRSS2	PPH11318A		
D07	Hs.661014	NM_153692	HTRA4	HtrA serine peptidase 4	-	PPH16906A		
D08	Hs.520819	NM_005542	INSIG1	Insulin induced gene 1	CL-6/CL6	PPH06359B		
D09	Hs.7089	NM_016133	INSIG2	Insulin induced gene 2	-	PPH07473A		
D10	Hs.436446	NM_006010	MANF	Mesencephalic astrocyte-derived neurotro	ARMET/ARP	PPH20589B		
D11	Hs.125503	NM_002753	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10	JNK3/JNK3A/PRKMI	PPH00743C		
D12	Hs.138211	NM_002750	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK/JNK-46/JNK1/J	PPH00720B		
E01	Hs.484371	NM_002752	MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	JNK-55/JNK2/JNK2A	PPH00719F		
E02	Hs.75890	NM_003791	MBTPS1	Membrane-bound transcription factor pepti	PCSK8/S1P/SK1-1	PPH06373B		
E03	Hs.443490	NM_015884	MBTPS2	Membrane-bound transcription factor pepti	BRESEK/FAP/KFS2	PPH06358A		
E04	Hs.464333	NM_017921	NPLC4	Nuclear protein localization 4 homolog (S.	NPL4	PPH17673A		
E05	Hs.631602	NM_006184	NUCB1	Nucleobindin 1	CALNUC/NUC	PPH13532B		
E06	Hs.527861	NM_006812	OS9	Osteosarcoma amplified 9, endoplasmic re	ERLEC2/OS-9	PPH10013A		
E07	Hs.591095	NM_005313	PDIA3	Protein disulfide isomerase family A, mem	ER60/ERp57/Erp60	PPH01714A		
E08	Hs.492516	NM_012394	PF2D2	Prefoldin subunit 2	PF2D	PPH16387A		
E09	Hs.655327	NM_002624	PF2D5	Prefoldin subunit 5	MM-1/MM1/PFD5	PPH16317A		
E10	Hs.393331	NM_021130	PP1A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibit	CYP/ACY/PH/HEL-S-	PPH01310C		
E11	Hs.631593	NM_014330	PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibit	GADD34	PPH02081E		
E12	Hs.610830	NM_002743	PRKCSH	Protein kinase C substrate 80K-H	AGE-R2/G19P1/PC	PPH23322A		
F01	Hs.744151	NM_007218	RNF139	Ring finger protein 139	HRCAT1/RCA1/TRC8	PPH01187A		
F02	Hs.731774	NM_006913	RNF5	Ring finger protein 5	RING5/RMA1	PPH23045B		
F03	Hs.518244	NM_002950	RPN1	Ribophorin 1	OST1/RBPH1	PPH07134A		
F04	Hs.531789	NM_012235	SCAP	SREBF chaperone	-	PPH06364A		
F05	Hs.744859	NM_003262	SEC62	SEC62 homolog (S. cerevisiae)	Dtrp1/HTP1/TLOC1/	PPH01455A		
F06	Hs.26904	NM_007214	SEC63	SEC63 homolog (S. cerevisiae)	DNAJC23/Erj2/PR	PPH17044A		
F07	Hs.181300	NM_005065	SEL1L	Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	PRO1063/SEL1-L/KE	PPH06886A		
F08	Hs.32148	NM_203472	VIMP	Selenoprotein S	AD-015/ADO15/SBB	PPH58228A		
F09	Hs.518326	NM_014445	SERP1	Stress-associated endoplasmic reticulum	RAMP4	PPH20909B		
F10	Hs.483521	NM_022464	SIL1	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum cha	BAP/MSS/ULG5	PPH16379B		
F11	Hs.592123	NM_004176	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcript	SREBP-1c/SREBP1	PPH00393A		
F12	Hs.443258	NM_004599	SREBF2	Sterol regulatory element binding transcript	SREBP-2/SREBP2/b	PPH00240F		
G01	Hs.75859	NM_172230	SYVN1	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	DER3/HRD1	PPH16893A		
G02	Hs.363137	NM_030752	TCP1	T-complex 1	CCT-alpha/CCT1/CC	PPH05929C		
G03	Hs.534312	NM_000113	TOR1A	Torsin family 1, member A (torsin A)	DQ2/DYT1	PPH15669F		
G04	Hs.529420	NM_182688	UBE2G2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2	UBC7	PPH15063A		
G05	Hs.191987	NM_194458	UBE2J2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2	NCUBE-2/NCUBE2/F	PPH21004A		
G06	Hs.591242	NM_014607	UBX4	UBX domain protein 4	UBXD2/UBXDC1/era	PPH17500C		
G07	Hs.474213	NM_005659	UFD1L	Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	UFD1	PPH19152A		
G08	Hs.743306	NM_020120	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransfer	HUGT1/UGCLG1/UG	PPH11004A		
G09	Hs.193226	NM_020121	UGGT2	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransfer	HUGT2/UGCLG2/UG	PPH16704A		
G10	Hs.464416	NM_005151	USP14	Ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guan	TGT	PPH02332A		
G11	Hs.529782	NM_007126	VCP	Valosin containing protein	ALS14/HEL-220/HEL	PPH19422C		
G12	Hs.437638	NM_005080	XBP1	X-box binding protein 1	TREB-5/TREB5/XBP	PPH02850A		
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	BRWS1/PS1/TP5BP	PPH00073G		
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	-	PPH01094E		
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenat	G3PD/GAPD/HEL-S-	PPH00150F		
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPR1/HPRT	PPH01018C		
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	L10E/LP0/PRLPQ	PPH21138F		
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A			
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	PPX63340A		
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	PPX63340A		
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	PPX63340A		
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC			
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC			
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC			

## **VI – Referências Bibliográficas**



ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ADAMS J., PALOMBELLA V. J., SAUSVILLE E. A., JOHNSON J., DESTREE A., LAZARUS D. D., MAAS J., PIEN C. S., PRAKASH S., ELLIOTT P. J. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. **Cancer Res.** 59:2615–2622. 1999.

ALERA MT, HERMANN L, TAC-AN IA, *et al.* Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerg Infect Dis**;21:722-4. 2015.

ALFANO C, GLADWYN-NG I, COUDERC T, LECUIT M, NGUYEN L. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. **Front Cell Neurosci.** 2019;13:94. Published 2019 Mar 26.

ALVAREZ DE, LODEIRO MF, LUDUENA SJ, PIETRASANTA LI, GAMARNIK AV. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome, **J. Virol.**, vol. 79 (pg. 6631-6643). 2005.

AMBROSE R.L. AND MACKENZIE J.M. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. **Journal of Virology** ;85, 2723–2732. 2010.

AMBROSE R.L. AND MACKENZIE J.M. ATF6 signaling is required for efficient West Nile virus replication by promoting cell survival and inhibition of innate immune responses. **Journal of Virology** 87, 2206–2214. 2013a.

AMBROSE R.L. AND MACKENZIE J.M. Flaviviral regulation of the unfolded protein response: can stress be beneficial? **Future Virol.** 8, 1095–1109. 2013b.

AMORIM R, TEMZI A, GRIFFIN BD, MOULAND AJ. Zika virus inhibits eIF2 $\alpha$ -dependent stress granule assembly. **PLoS Negl Trop Dis** 11 (7): e0005775. 2017.

ANFASA F, SIEGERS JY, VAN DER KROEG M, N MUMTAZ, STALIN RAJ V, DE VRIJ FMS, W WIDAGDO, GABRIEL G, SALINAS S, SIMONIN Y, REUSKEN C, KUSHNER SA, KOOPMANS MPG, HAAGMAN B, MARTINA BEE, VAN RIEL D. Phenotypic Differences between Asian and African Lineage Zika Viruses in Human Neural Progenitor Cells. **mSphere** 2: e00292-17. 2017.

ARMSTRONG, P. *et al.* Travel-Associated Zika Virus Disease Cases Among U.S. Residents--United States, January 2015-February 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 11, p. 286–9, 25 mar. 2016.

ATKINSON, B. *et al.* Detection of Zika Virus in Semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 940–940. 2016.

BALM MN, LEE CK, LEE HK, CHIU L, KOAY ES, TANG JW. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **J Med Virol**, 84:1501–1505. 2012.

BARCELLOS C, XAVIER DR, PAVÃO AL, *et al.* Increased Hospitalizations for Neuropathies as Indicators of Zika Virus Infection, according to Health Information System Data, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2016;22(11):1894–1899.

BARONTI C, PIORKOWSKI G, CHARREL RN, BOUBIS L, LEPARC-GOFFART I, DE LAMBALLERIE X. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. **Genome Announc.** 2(3):e00500-14. 2014.

BARZON L, PACENTI M, FRANCHIN E, PAGNI S, MARTELLO T, CATTAI M, *et al.* Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. **J Infect Dis.**, 208:1086–92. 2013.

BASU R, TUMBAN E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. **Virology Journal** ;13:165. 2016.

BEARCROFT WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 50:442–448. 1956.

BELMONT PJ, TADIMALLA A, CHEN WJ, MARTINDALE JJ, THUERAUF DJ, MARCINKO M, GUDE N, SUSSMAN MA, GLEMBOTSKI CC. Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. **J Biol Chem.** 16; 283(20):14012-21. 2008.

BELMONT P.J., CHEN W.J., THUERAUF D.J., GLEMBOTSKI C.C. Regulation of microRNA expression in the heart by the ATF6 branch of the ER stress response. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 52, pp. 1176–1182. 2012.

BERTOLOTTI A, ZHANG Y, HENDERSHOT LM, HARDING HP, RON D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nat Cell Biol.**;2(6):326-32. 2000.

BLÁZQUEZ AB, ESCRIBANO-ROMERO E, MERINO-RAMOS T, SAIZ JC, MARTÍN-ACEBES MA. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. **Front. Microbiol.**, 03 June 2014.

BONALDO MC, RIBEIRO IP, LIMA NS, SANTOS AAC, MENEZES LSR, CRUZ SOD, *et al.* Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. **bioRxiv**; p. 045443. 2016.

BOORMAN JP, PORTERFIELD JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** May; 50(3):238-42. 1956.

BOYCE M, BRYANT KF, JOUSSE C, LONG K, HARDING HP, SCHEUNER D, KAUFMAN RJ, MA D, COEN DM, RON D, YUAN J. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. **Science**. 11; 307(5711):935-9. 2005.

BRASIL P., *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro—Preliminary Report. **N Engl J Med**, 2016.

BRIANT L, DESPRÈS P, CHOUMET V, MISSÉ D. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology** 464–465:26–32. 2014.

BROOKS RB, CARLOS MP, MYERS RA, WHITE MG, BOBO-LENOCI T, APLAN D, BLYTHE D, KA FELDMAN. Likely Sexual Transmission of Zika Virus from a Man With No Symptoms of Infection — Maryland, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. 65(34):915-916. 2016.

BORIUSHKIN E, WANG JJ, ZHANG SX. Role of p58IPK in Endoplasmic Reticulum Stress-associated Apoptosis and Inflammation. **J Ophthalmic Vis Res.** ; 9(1): 134–143. 2014.

BUATHONG R, HERMANN L, THAISOMBOONSUK B, *et al.* Detection of Zika virus infection in Thailand, 2012-2014. **Am J Trop Med Hyg**; 93:380-3. 2015.

CALFON, M., ZENG, H., URANO, F., TILL, J.H., HUBBARD, S.R., HARDING, H.P., CLARK, S.G. and RON, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, 415, 92-96. 2002.

CALISHER CH, KARABATSOS N, DALRYMPLE JM, SHOPE RE, PORTERFIELD JS, WESTAWAY EG, BRANDT WE. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **J Gen Virol** 70:37–43. 1989.

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**; 16:653-660. 2016.

CAMPOS G.S., BANDEIRA A.C., AND SARDI S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 21(10): p. 1885–6. 2015.

CAMPOS, R. DE M. *et al.* Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 77, p.69–70. 2016.

CAO-LORMEAU VM. RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg Infect Dis.**, 20:1085-1086. 2014.

CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**. 2016.

CHAKRABARTI, A., A. W. CHEN, *et al.* A review of the mammalian unfolded protein response. **Biotechnol Bioeng**, v.108, n.12, Dec, p.2777-93. 2011.

CHAMBERS TJ, HAHN CS, GALLER R, RICE CM. *Flavivirus* genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol** 44: 649–688. 1990.

CHAN SW AND EGAN PA. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. **FASEBJ**. 19, 1510–1512. 2005.

CHEN X, SHEN J, PRYWES R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. **J Biol Chem**. 12; 277(15):13045-52. 2002.

CHEN X, DUAN L, -H, LUO P, HU G, YU X, LIU J, LU H, LIU B: FBXO6-Mediated Ubiquitination and Degradation of Ero1L Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis. **Cell Physiol Biochem**;39:2501-2508. 2016.

CHUA A, PRAT I, NUEBLING CM, WOOD D, MOUSSY F. Update on Zika Diagnostic Tests and WHO's Related Activities. **PLoS Negl Trop Dis** 11(2): e0005269. 2017.

CHUNYAN XU, BEATRICE BAILLY-MAITRE, AND JOHN C. REED. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **J Clin Invest**. 1; 115(10): 2656–2664. 2005.

CLARKE B.D., ROBY J.A., SLONCHAK A., KHROMYKH A.A. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. **Virus Res**. 3, 206:53-61. 2015.

CLYDE, K., KYLE, J.L., HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v.80, n.23, p.11418-31. 2006.

CORMACK B.P., VALDIVIA R.H., FALKOWAB S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**. Volume 173, Issue 1, Pages 33-38. 1996.

CORTESE M, GOELLNER S, ACOSTA EG, NEUFELDT CJ, OLEKSIUK O, LAMPE M, *et al.* Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell Reports**. 18, 2113–2123. 2017.

COX, J. S., C. E. SHAMU, *et al.* Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum-resident proteins requires a transmembrane protein kinase. **Cell**, v.73, n.6, Jun 18, p.1197-206. 1993.

COX, J. S. AND WALTER, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. **Cell** 87, 391-404. 1996.

CUGOLA FR, FERNANDES IR, RUSSO FB, FREITAS BC, DIAS JLM, GUIMARÃES KP, BENAZZATO C; *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature** 534, 267–271. 2016.

DE PAULA FREITAS B, DE OLIVEIRA DIAS JR, PRAZERES J, SACRAMENTO GA, KO AI, MAIA M, *et al.* Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. **JAMA Ophthalmol.** 2016.

DIAS MVG, NASCIMENTO MP, SILVA BAF, *et al.* Análise Epidemiológica dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika, Semana Epidemiológica 1 a 52, 2017. Boletim epidemiológico, Faculdade de Ciências da Saúde/UnB. Volume 1 No.4. 2017.

DIAS MVG, NASCIMENTO MP, SILVA BAF, *et al.* Análise Epidemiológica dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika, Semana Epidemiológica 1 a 5, do ano de 2018. Boletim epidemiológico, Faculdade de Ciências da Saúde/UnB. Volume 2 No.1. 2018.

DIAGNE CT, DIALLO D, FAYE O, BA Y, FAYE O, GAYE A, *et al.* Potential of selected Senegalese *Aedes spp.* mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) to transmit Zika virus. **BMC Infect Dis.**, 15:492. 2015.

DICK G.W., KITCHEN S.F., AND HADDOW A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 46(5): p. 509–20. 1952.

Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, *et al.* Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**; 267: 36–40. 2008.

DRIGGERS RW, HO C-Y, KORHONEN EM, *et al.* Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **N. Engl. J. Med.** 374:2142-2151. 2016.

DUFFY M, CHEN T, HANCOCK T, POWERS A, KOOL J, 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. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, 360:2536-2543. 2009.

DUPONT-ROUZEYROL M, O'CONNOR O, CALVEZ E, *et al.* Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerg Infect Dis**; 21:381-2. 2015.

ECDC – Europe centre for disease prevention and control. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, French Polynesia. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, February 14, 2014. (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Zika-virus-French-Polynesia-rapid-risk-assessment.pdf>).

ECDC – Europe centre for disease prevention and control. 2016. Acesso em: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika\\_virus\\_infection/factsheet-health-professionals/Pages/factsheet\\_health\\_professionals.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/factsheet-health-professionals/Pages/factsheet_health_professionals.aspx)

ECDC – Europe centre for disease prevention and control. Epidemiological situation. 2017. Acesso em: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika\\_virus\\_infection/zika-outbreak/Pages/epidemiological-situation.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/zika-outbreak/Pages/epidemiological-situation.aspx)

ESTOFOLETE CF, TERZIAN ACB, PARREIRA R, ESTEVES A, HARDMAN L, GREQUE GV, RAHAL P, NOGUEIRA ML. Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: A case series. **Journal of Clinical Virology**. 81 25–30. 2016.

FAGBAMI AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J Hyg (Lond)**;83:213-9. 1979.

FAIZAN MI, ABDULLAH M, ALI S, NAQVI IHB, AHMED A, PARVEEN S. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. **Intervirology** ;59(3):152-158. 2016.

FAYE O, FREIRE CCM, IAMARINO A, FAYE O, DE OLIVEIRA JVC, DIALLO M, *et al.* Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th Century. **PLoS Negl Trop Dis.**, 8:e2636. 2014.

FAYE O, FAYE O, DIALLO D, DIALLO M, WEIDMANN M, SALL AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology**, 10:311. 2013.

FAYE O, FAYE O, DUPRESSOIR A, WEIDMANN M, NDIAYE M, SALL AA. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **J Clin Virol**, 43:96– 101. 2008.

FONSECA K, MEATHERALL B, ZARRA D, DREBOT M, MACDONALD J, PABBARAJU K, WONG S, WEBSTER P, LINDSAY R, TELLIER R. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **Am J Trop Med Hyg** 91:1035–1038. 2014.

FOY BD, KOBYLINSKI KC, CHILSON FOY JL, BLITVICH BJ, TRAVASSOS DA ROSA A, HADDOW AD, *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**. 17:880–2. 2011.

FRASER J.E. *et al.* A nuclear transport inhibitor that modulates the unfolded protein response and provides in vivo protection against lethal Dengue virus infection. **Journal of Infectious Diseases** 210, 1780–1791. 2014.

FRIEDMAN A.D. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. **Cancer Res**. 56: 3250-3256. 1996.

GARCEZ PP, CORREIA LOIOLA E, MADEIRO DA COSTA R, HIGA LM, TRINDADE P, DELVECCHIO R, *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, 352:816-818. 2016.

GARDNER, B. M.; WALTER, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. **Science** 333: 1891-1894, 2011.

GATHERER D. AND KOHL A., Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J Gen Virol**, 97(2): p. 269–73. 2016.

GENTZ, SHL. A apoptose induzida pelo anti-inflamatório não esteróide salicilato de sódio requer a participação da proteína cinase GCN2 e o envolvimento de vias do estresse do retículo endoplasmático. 2011. 128f. Tese [Doutorado em Biologia Celular ICB – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte]. 2011.

GILLESPIE LK, HOENEN A, MORGAN G AND MACKENZIE JM. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. **J. Virol**. 84, 10438–10447.2010.

GLADWYN-NG I, CORDÓN-BARRIS L, ALFANO C, *et al.* Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. **Nature Neuroscience**. 21, 63–71. 2018.

GLOTZER JB, SALTIK M, CHIOCCA S, MICHOU AI, MOSELEY P, COTTEN M. Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. **Nature**. 14; 407(6801):207-11. 2000.

GOLLINS, S. W., AND PORTERFIELD, J. S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. **J. Gen. Virol**. 66:1969–1982. 1985.

GOODMAN AG, SMITH JA, BALACHANDRAN S, PERWITASARI O, PROLL SC, THOMAS MJ, KORTH TM, BARBER GN, SCHIFF LA AND KATZE MG. The Cellular Protein P58IPK Regulates Influenza Virus mRNA Translation and Replication through a PKR-Mediated Mechanism. **JOURNAL OF VIROLOGY**, Mar., p. 2221–2230. 2007.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2018 Release. 2018.

GORBALENYA, ALEXANDER E.; KRUPOVIC, MART; SIDDELL, STUART; VARSANI, ARVIND; KUHN, JENS H. Riboviria: establishing a single taxon that comprises RNA viruses at the basal rank of virus taxonomy. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2018.

GOURINAT AC, O'CONNOR O, CALVEZ E, GOARANT C, DUPONT-ROUZEYROL M. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86. 2015.

GREEN AM, BEATTY PR, HADJILAOU A AND HARRIS E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **J. Mol. Biol**. 426: 1148–1160. 2013.

HADDOW AD, SCHUH AJ, YASUDA CY, KASPER MR, HEANG V, *et al.* Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, 6(2): e1477. 2012.

HAGA Y, YANAGISAWA K, OHTO-OZAKI H, TOMINAGA S, MASUZAWA T AND IWAHANA H. The effect of ST2 gene product on anchorage-independent growth of a glioblastoma cell line, T98G. **Eur J Biochem** 270, 163–170. 2003.

HAMEL R, DEJARNAC O, WICHIT S, EKCHARIYAWAT P, NEYRET A, LUPLERTLOP N, PERERA-LECOIN M, SURASOMBATPATTANA P, TALIGNANI L, THOMAS F, CAO-LORMEAU VM, CHOUMET V, BRIANT L, DESPRÈS P, AMARA A, YSSEL H, MISSÉ D. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **J Virol** 89:8880–8896. 2015.

HAMMOND C, HELENIUS A. Quality control in the secretory pathway. **Curr Opin Cell Biol**. Aug; 7(4):523-9. 1995.

HAMPTON RY. ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. **Curr Biol**. Jul 13; 10(14):R518-21. 2000.

HARDING HP, ZHANG Y, RON D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**. 397(6716):271-4. 1999.

HARDING HP, ZHANG Y, BERTELOTTI A, ZENG H, RON D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol Cell.**; 5(5):897-904. 2000a.

HARDING HP, NOVOA I, ZHANG Y, ZENG H, WEK R, SCHAPIRA M, RON D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Mol Cell.**; 6(5):1099-108. 2000b.

HAYES EB, Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis**, 15(9): p. 1347–50. 2009.

HAYNES, C. M., E. A. TITUS, *et al.* Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. **Mol Cell**, v.15, n.5, Sep 10, p.767-76. 2004.

HAZE K, YOSHIDA H, YANAGI H, YURA T, MORI K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol Biol Cell.**; 10(11):3787-99. 1999.

HEANG V, YASUDA CY, SOVANN L, *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerg Infect Dis**; 18:349-51. 2012.

HEINZ FX & STIASNY K. Flavivirus membrane fusion. **J Gen Virol**, vol. 87, 2755-2766. 2006

HENDERSHOT LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. **Mt Sinai J Med.** Oct; 71(5):289-97. 2004.

HERSHKO A, HELLER H, ELIAS S, CIECHANOVER A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **J Biol Chem.** Jul 10; 258(13):8206-14. 1983.

HETZ C, GLIMCHER LH. Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. **Mol Cell.** 35(5):551–561. 2009.

HETZ, C; MARTINO, F; RODRIGUEZ, D; GLIMCHER, L. H. The Unfolded Protein Response: Integrating stress signals through the stress sensor IRE1 $\alpha$ . **Physiological Reviews.** 91:1219-43, 2011.

HETZ C., CHEVET E. AND HARDING H.P. Targeting the unfolded protein response in disease. **Nature Reviews Drug Discovery** 12, 703–719. 2013.

HOLLIEEN, J., J. H. LIN, *et al.* Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. **J Cell Biol**, v.186, n.3, Aug 10, p.323-31. 2009.

HOLLIEEN, J. Evolution of the unfolded protein response. **Biochim Biophys Acta.**;1833(11):2458-63, 2013.

HOOPER, P. L; HIGHTOWER, L. E; HOOPER, P. L. Loss of stress response as a consequence of viral infection: implications for disease and therapy. **Cell Stress Chaperones**; v.17(6):647-55, 2012.

HONDA K, YANAI H, NEGISHI H, ASAGIRI M, SATO M, MIZUTANI T, SHIMADA N, OHBA Y, TAKAOKA A, YOSHIDA N, TANIGUCHI T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, 434:772–777. 2005.

JACKSON WT, GIDDINGS TH JR, TAYLOR MP, MULINYAWA S, RABINOVITCH M, KOPITO RR, KIRKEGAARD K. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. **PLoS Biol.** May; 3(5):e156. 2005.

ICTV. SIMMONDS, P., BECHER, B., BUKH, J., GOULD, E.A., MEYERS, G., MONATH, T., MUERHOFF, S., PLETNEV, A., RICO-HESE, R., SMITH, D.B., STAPLETON, J.T., and ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae, **Journal of General Virology**, 98:2–3. 2018.

IRANPOUR M, MOGHADAM AR, YAZDI M, *et al.* Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine.** 2016.

ISHAK, R., TOVEY, D. G., AND HOWARD, C. R. Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. **J. Gen. Virol.** 69:325–335. 1988.

JAN C, LANGUILLAT G, RENAUDET J, ROBIN Y. A serological survey of arboviruses in Gabon [in French]. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**; 71:140–6. 1978.

JAROSCH E, LENK U, SOMMER T. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. **Int Rev Cytol.** 223:39-81. 2003.

JOHNSON AJ, MARTIN DA, KARABATSOS N, ROEHRIG JT. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody based capture enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol** 38:1827–1831. 2000.

JORDAN R, WANG L, GRACZYK TM, BLOCK TM AND ROMANO PR. Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. **J. Virol.** 76, 9588–9599. 2002.

JUNJHON J, PENNINGTON JG, EDWARDS TJ, PERERA R, LANMAN J, KUHN RJ. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. **J. Virol.** 88, 4687–4697. 2014.

JURADO, KA *et al.* Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. **JCI Insight**, v. 1, n. 13, 18. 2016.

JURKIN, J.; HENKEL, T.; NIELSEN, A. F.; MINNICH, M.; POPOW, J.; KAUFMANN, T.; HEINDL, K.; HOFFMANN, T.; BUSSLINGER, M.; MARTINEZ, J. The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. **EMBO J.** 33(24): 2922-2936, 2014.

KADOWAKI H. AND NISHITOH H. Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and Their Roles in Disease. **Genes**, 4(3), 306-333. 2013.

KANEKO M, NIINUMA Y, NOMURA Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. **Biol Pharm Bull.**; 26(7):931-5. 2003.

KELKAR N, GUPTA S, DICKENS M, DAVIS RJ. Interação de um módulo de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno com a proteína neuronal JIP3. **Mol Cell Biol** .; 20 (3): 1030-1043. 2000.

KE PY AND CHEN SS. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. **J. Clin. Invest.** 121, 37–56. 2011.

KLASE ZA, KHAKHINA S, SCHNEIDER ADE B, CALLAHAN MV, GLASSPOOL-MALONE J MALONE R. Zika Fetal Neuropathogenesis: Etiology of a Viral Syndrome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004877, 25 ago. 2016.

KIM I, XU W, REED JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov.**; 7(12):1013-30. 2008.

KORENNYKH, A. V; EGEE, P.F; KOROSTELEV, A. A; FINER-MOORE, J; STROUD, R. M; ZHANG, C; SHOKAT, K. M; WALTER, P. Cofactor-mediated conformational control in the bifunctional kinase/RNase Ire1. **BMC Biol.** V. 9(48), 2011.

KUDO T., KANEMOTO S., HARA H., MORIMOTO N., MORIHARA T., KIMURA R., TABIRA T., IMAIZUMI K., TAKEDA M. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. **Cell Death Differ.** 15:364–375. 2008.

KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, PLETNEV SV, CORVER J, LENCHE E, JONES CT, MUKHOPADHYAY S, CHIPMAN PR, STRAUSS EG, BAKER TS, STRAUSS JH. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, 108, 717–725. 2002.

KUMAR R, TRIPATHI S, TAMBE JJ, *et al.* Dengue encephalopathy in children in Northern India: clinical features and comparison with non dengue. **Journal of the Neurological Sciences**; 269: 41–48. 2008.

KUMAR M, RAWAT P, KHAN SZ, DHAMIJA N, CHAUDHARY P, RAVI DS, MITRA D. Reciprocal regulation of human immunodeficiency virus-1 gene expression and replication by heat shock proteins 40 and 70. **J Mol Biol.** 29; 410(5):944-58. 2011.

KUNO G, CHANG GJ, TSUCHIYA KR, KARABATSOS N, CROPP CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. **J Virol**, 72(1): p. 73–83. 1998.

KUNO G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. **Adv Virus Res** 61:3– 65. 3527(03)61001-8. 2003.

KUNO G, CHANG GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, 152: 687–696. 2007.

KWONG JC, DRUCE JD, LEDER K. Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. **Am J Trop Med Hyg.** 89:516–7. 2013.

LANCIOTTI RS, KOSOY OL, LAVEN JJ, VELEZ JO, LAMBERT AJ, JOHNSON AJ, *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**, 14:1232-1239. 2008.

LEÃO, T. Indução do estresse do retículo endoplasmático celular pelo Vaccinia virus: modulação da via UPR durante a infecção viral. 2013. 93f. Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)] – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2013.

LEE AH, IWAKOSHI NN AND GLIMCHER LH. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. **Mol Cell Biol.**; 23(21): 7448–7459. 2003a.

LEE A. H., IWAKOSHI N. N., ANDERSON K. C., GLIMCHER L. H. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100:9946–9951. 2003b.

LEE D, SINGARAVELU G, PARK BJ, AHNN J. Differential requirement of unfolded protein response pathway for calreticulin expression in *Caenorhabditis elegans*. **J Mol Biol.** 14;372(2):331-40. Epub 2007 Jul 3. 2007.

LEE, D. Y.; LEE, K.; LEE, H. J.; KIM, D. H.; NOH, Y. H.; YU, K.; JUNG, H.; LEE, S. A.; LEE, J. Y.; YOUN, Y. C.; JEONG, Y.; KIM, D. A.; LEE, W. B.; KIM, S. S. Activation of PERK Signaling Attenuates Ab-Mediated ER Stress. **PLoS ONE**. v. 5, i. 5, 2010.

LEMKE G, ROTHLIN CV. Immunobiology of the TAM receptors. **Nat Rev Immunol**. 8:327–336. 2008.

LI J, LEE AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. **Curr Mol Med**.;6(1):45-54. 2006.

LI, J.; NI, M.; LEE, B.; BARRON, E.; HINTON, D. R.; LEE, A. S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. **Cell Death and Differentiation**. 15: 1460-1471, 2008.

LI S, YE L, YU X, XU B, LI K, ZHU X, *et al*. Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic

LI G, ZHANG J, TONG X, LIU W, YE X. Heat shock protein 70 inhibits the activity of Influenza A virus ribonucleoprotein and blocks the replication of virus in vitro and in vivo. **PLoS One**. 24; 6(2):e16546. 2011.

LIM PY, BEHR MJ, CHADWICK CM, SHI PY, BERNARD KA. Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. **J Virol** 85:5197–5201. 2011.

LIMON-FLORES AY, PEREZ-TAPIA M, ESTRADA-GARCIA I, VAUGHAN G, ESCOBAR-GUTIERREZ A, CALDERON-AMADOR J, HERRERA-RODRIGUEZ SE, BRIZUELA-GARCIA A, HERAS-CHAVARRIA M, FLORES-LANGARICA A, CEDILLO-BARRON L, FLORES-ROMO L. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **Int J Exp Pathol** 86:323–334. 2005.

LINDENBACH BD, MURRAY CL, THILE HJ, RICE CM, “Flaviviridae: The Viruses and Their Replication,” in Fields Virology, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (vol. 1, **Lippincott Williams & Wilkins**), pp. 1101–1152. 2013.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, v.59, p.23-61. 2003.

LINDENBACH BD, MURRAY CL, THIEL H-J, RICE CM. *Flaviviridae*. Fields virology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2013.

LIU H, BOWES RC RD, VAN DE WATER B, SILLENCE C, NAGELKERKE JF, STEVENS JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells. **J Biol Chem**. 29; 272(35):21751-9. 1997.

LIVAK, Kenneth J & SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. **METHODS** 25, 402–408 (2001).

LOO YM, FORNEK J, CROCHET N, BAJWA G, PERWITASARI O, MARTINEZ-SOBRIDO L, AKIRA S, GILL MA, GARCÍA-SASTRE A, KATZE MG, MICHAEL GALE, JR. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 335–345, 1. 2008.

LU PD, HARDING HP, RON D. Translation re-initiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. **J Cell Biol** 167:27–33. 2004.

LUO B AND LEE AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anti-cancer therapies. **Oncogene**. 14; 32(7):10. 2013.

MA Y, BREWER JW, DIEHL JA, HENDERSHOT LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. **J Mol Biol**. 17; 318(5):1351-65. 2002.

MACNAMARA FN. 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. 1954.

MAEDA A, MAEDA J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Vet J** 195:33–40. 2013.

MANOKARAN G, FINOL E, WANG C, GUNARATNE J, BAHL J, ONG E, TAN H, SESSIONS OM, WARD AM, GUBLER DJ, HARRIS E, GARCIA-BLANCO MA, OOI EE. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. **Science**. 9;350(6257):217-21. 2015.

MARANO, G. *et al*. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. **Blood transfusion = Transfusione del sangue**, v. 14, n. 2, p.95–100. 2016.

MARCHETTE NJ, GARCIA R, RUDNICK A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg**. May; 18(3):411-5. 1969.

MARCINAK SJ, RON D. The unfolded protein response in lung disease. **Proc Am Thorac Soc**.; 7(6):356-62. 2010.

MARCINIAK SJ, YUN CY, OYADOMARI S, NOVOA I, ZHANG Y, JUNGREIS R, NAGATA K, HARDING HP, RON D. Chop induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes Dev.** 2004 Dec 15;18(24):3066-77. 2004.

MARTIN DA, MUTH DA, BROWN T, JOHNSON AJ, KARABATSOS N, ROHRIG JT. Standardization of immunoglobulin capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **J Clin Microbiol** 38:1823–1826. 2000.

MARTINES RB, BHATNAGAR J, KEATING MK, SILVA-FLANNERY L, MUEH-LENBACHS A, GARY J, *et al.* 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. 2016.

MATSUMOTO M, MINAMI M, TAKEDA K, SAKAO Y, AKIRA S. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. **FEBS Letters**; 395:143–147. 1996.

MCCRAE AW, KIRYA BG. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 76(4):552-62. 1982.

MCMILLAN DR, GETHING MJ, SAMBROOK J. The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. **Curr Opin Biotechnol.**;5:540–545. 1994.

MCMINN PC. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. **Journal of General Virology**; 78(Pt 11):2711–2722. 1997.

MCULLOUGH K.D., MARTINDALE, J.L., KLOTZ, L.O., AW, T.Y., AND HOLBROOK, N.J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Mol. Cell. Biol.** 21: 1249-1259. 2001.

MEDIGESI G.R. *et al.* West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. **Journal of Virology** ;81, 10849–10860. 2007

MELVILLE MW, HANSEN WJ, FREEMAN BC, WELCH WJ, KATZE MG. The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of P58IPK, the cellular inhibitor of PKR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A.** 7; 94(1):97-102. 1997.

MEUSSER B, HIRSCH C, JAROSCH E, SOMMER T. ERAD: the long road to destruction. **Nat Cell Biol.**; 7(8):766-72. 2005.

MIRANDA-FILHO DDE B, MARTELLI CM, XIMENES RA, ARAUJO TV, ROCHA MA, RAMOS RC, *et al.* Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **Am J Public Health.** 106(4):598–600. 2016.

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.

MOORE DL, CAUSEY OR, CAREY DE, *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Ann Trop Med Parasitol** ;69:49-64. 1975.

MORI, K., KAWAHARA, T., YOSHIDA, H., YANAGI, H. AND YURA, T. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. **Genes Cells** 1, 803-817. 1996.

MORI K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell.** 26; 101(5):451-4. 2000.

MORISHIMA, N., K. NAKANISHI, *et al.* Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) via induction of WW domain binding protein 1. **J Biol Chem**, Aug 13. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe epidemiológico N° 15 – Semana epidemiológica (SE) 08/2016 (21 A27/02/2016) Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil. 2016: Brasília, Brasil. 2016a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia. Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional – ESPIN. 2016b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe epidemiológico N° 2 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. 2018: Brasília, Brasil. 2018a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe epidemiológico N° 36 – Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32 de 2018. 2018: Brasília, Brasil. 2018b.

MUÑOZ-JORDÁN JL AND FREDERICKSEN BL. How Flaviviruses Activate and Suppress the Interferon Response. **Viruses**, 2(2), 676-691. 2010.

MUSSO, D; NILLES, E J; CAO-LORMEAU, VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. O595-6. 2014a.

MUSSO D, NHAN T, ROBIN E, ROCHE C, BIERLAIRE D, ZISOU K, SHAN YAN A, CAO-LORMEAU VM, BROULT J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill.** 10;19(14). 2014b.

MUSSO D, ROCHE C, ROBIN E, NHAN T, TEISSIER A, CAO-LORMEAU V. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–61, fev. 2015a.

MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 68, p. 53–5, jul. 2015b.

MUSSO D, GUBLER DJ. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev.** 29(3):487-524. 2016.

NADANAKA S, YOSHIDA H, KANO F, MURATA M, MORI K. Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. **Mol Biol Cell.**; 15(6):2537-48. 2004.

NAKAGAWA T, ZHU H, MORISHIMA N, LI E, XU J, YANKNER BA, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature.** 403:98–103. 2000.

NG, M. L., AND LAU, L. C. Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. **Arch. Virol.** 100(3):199–211. 1988.

NIKAWA, J., AKIYOSHI, M., HIRATA, S. AND FUKUDA, T. *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. **Nucl. Acids Res.** 24, 4222-4226. 1996.

NOVOA I, ZENG H, HARDING HP, RON D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. **J Cell Biol.** 28; 153(5):1011-22. 2001.

OEHLER E., *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, 19(9). 2014.

OIKAWA D, KITAMURA A, KINJO M, IWAWAKI T. Direct association of unfolded proteins with mammalian ER stress sensor, IRE1 $\beta$ . **PLoS One.**;7(12):e51290. 2012.

OLIVEIRA WK, *et al.* Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy—Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 65(9): p. 242–7. 2016.

OLSON JG, KSIAZEK TG, SUHANDIMAN, TRIWIBOWO. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg** ;75:389-93. 1981.

OLSON, CK *et al.* Preventing Transmission of Zika Virus in Labor and Delivery Settings Through Implementation of Standard Precautions - United States, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 11, p. 290–2, 25. 2016.

ONOGUCHI, K.; YONEYAMA, M.; FUJITA, T. Retinoic Acid-Inducible Gene-1-Likem Receptors. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 1, p. 27–31. 2011.

ÖZCAN U, YILMAZ E, ÖZCAN L, *et al.* Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. **Science (New York, NY).**;313(5790):1137-1140. 2006.

OZCAN L AND TABAS I. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disease and Other Disorders. **Annu Rev Med.**; 63: 317–328. 2012.

OSLOWSKI CM AND URANO F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. **Methods Enzymol.**; 490: 71–92. 2011.

OTERO JH, LIZAK B, HENDERSHOT LM. Life and death of a BiP substrate. **Semin Cell Dev Biol.** 21(5):472-8. 2010.

PAHL HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. **Physiol Rev.**; 79(3):683-701. 1999.

PAHO - Pan American Health Organization. Epidemiological Alert Zika virus infection. 2015. Pan American Health Organization, Washington, DC. 2015a.

PAHO - Pan American Health Organization. Epidemiological update. Zika virus infection. 16 October 2015. Pan American Health Organization, Washington, DC. 2015b.

PAHO - Pan American Health Organization. Diagnóstico por laboratorio para la enfermedad por el virus del Zika. Pan American Health Organization, Washington, DC. 2016.

PATIÑO-BARBOSA, A. M. *et al.* Zika: another sexually transmitted infection? **Sexually transmitted infections.** v. 91, n. 5, p. 359. 2015.

PENA J AND HARRIS E. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. **J. Biol.Chem.** 286, 14226–14236. 2011.

PERERA R, RILEY C, ISAAC G, HOPF-JANNASCH AS, MOORE RJ, WEITZ KW, *et al.* Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. **PLoSPathog.** 2012.

PERERA-LECOIN M, MEERTENS L, CARNEC X, AMARA A. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, 6:69-88. 2014.

PERKASA A, YUDHAPUTRI F, HARYANTO S, *et al.* Isolation of Zika virus from febrile patient, Indonesia. **Emerg Infect Dis.** 2016.

PERRI ER, THOMAS CJ, PARAKH S, SPENCER DM, ATKIN JD. The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. **Front Cell Dev Biol.** 2016 Jan 8;3:80. 2015

PIJLMAN GP, FUNK A, KONDRATIEVA N, LEUNG J, TORRES S, VAN DER AA L, LIU WJ, PALMENBERG AC, SHI PY, HALL RA, *et al.* . A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. **Cell Host Microbe**, vol. 4 (pg. 579-591). 2008.

PINGEN, M. *et al.* Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1455–1469, jun. 2016.

PIORKOWSKI G, RICHARD P, BARONTI C, GALLIAN P, CHARREL R, LEPARC-GOFFART I, LAMBALLERIE X. Complete coding sequence of Zika virus from Martinique Outbreak in 2015. **Genome Announc.**, 2:e00500-514. 2016.

PRESTWOOD TR, MORAR MM, ZELLWEGER RM, MILLER R, MAY MM, YAUCH LE, *et al.* Gamma interferon (IFN-gamma) receptor restricts systemic dengue virus replication and prevents paralysis in IFN-alpha/beta receptor-deficient mice. **J Virol.** , 86(23):12561-70. 2012.

RAO RV, BREDESEN DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. **Curr Opin Cell Biol.** 16(6):653-62. 2004.

RATHORE A.P., NG M.L. AND VASUDEVAN S.G. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2alpha phosphorylation. **Virology Journal** 10, 36. 2013.

REYES-DEL VALLE J, CHÁVEZ-SALINAS S, MEDINA F, DEL ANGEL RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **J Virol.** 79(8):4557-67. 2005.

RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. **Fields Virology**, 3rd edn, pp. 931–959. Philadelphia : Lippincott–Raven. 1996.

ROBIN Y, MOUCHET J. Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. **Bull Soc Pathol Exot Filiales.** 68(3):249-58. 1975.

ROME, S., V. LECOMTE, *et al.* Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. **Physiol Genomics**, v.34, n.3, Aug 15, p.327-37. 2008.

RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol.**; 8(7):519-29. 2007.

ROTH A, MERCIER A, LEPERS C, *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections — an unprecedented epidemic wave of mosquitoborne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveill** ;19(41). 2014.

ROTH H, MAGG V, UCH F, *et al.* Flavivirus Infection Uncouples Translation Suppression from Cellular Stress Responses [published correction appears in MBio. 2017 Apr 18;8(2):]. **MBio.** 2017;8(1):e02150-16. 2017.

RUTKOWSKI DT, KAUFMAN RJ. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol.**;14(1):20-8. 2004.

RUTKOWSKI DT, KANG SW, GOODMAN AG, GARRISON JL, TAUNTON J, KATZE MG, KAUFMAN RJ, HEGDE RS. The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. **Mol Biol Cell.**; 18(9):3681-91. 2007.

SALUZZO JF, GONZALEZ JP, HERVÉ JP, GEORGES AJ. Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic [in French]. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**; 74:490–9. 1981.

SALUZZO JF, IVANOFF B, LANGUILLAT G, GEORGES AJ. Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon [in French]. **Bull Soc Pathol Exot Filiales** ;75:262–6. 1982.

SAMALI A, FITZGERALD U, DEEGAN S, GUPTA S. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. **Int J Cell Biol.**;2010:830307. 2010.

SANO R, REED JC. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.** Volume 1833, Issue 12, Pages 3460–3470. 2013.

SARNO M, SACRAMENTO GA, KHOURI R, DO ROSÁRIO MS, COSTA F, ARCHANJO G, *et al.* Zika virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. **PLoS Negl Trop Dis.** 0:e0004517. 2016.

SCHADEWIJK AV, WOUT EFAV, STOLK J, HIEMSTRA PS. A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress. **Cell Stress and Chaperones.** 17:275–279. 2012.

SHAMU CE, COX JS, WALTER P. The unfolded-protein-response pathway in yeast. **Trends Cell Biol.**;4:56–60. 1994.

SCHARDT JA, MUELLER BU, PABST T. Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia. **Methods Enzymol.**;489:227-43. 2011.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I. & FRISE, E. *et al.* " Fiji: uma plataforma de código aberto para análise de imagens biológicas ", **Nature methods** 9 (7) : 676-682, PMID 22743772. 2012.

SCHNETTLER E, STERKEN MG, LEUNG JY, METZ SW, GEERTSEMA C, GOLDBACH RW, VLAK JM, KOHL A, KHROMYKH AA, PIJLMAN GP. Non-coding flavivirus RNA displays RNAi suppressor activity in insect and mammalian cells. **J Virol.** 86(24): 13486-500. 2012.

SCHRÖDER M, KAUFMAN RJ. ER stress and the unfolded protein response. **Mutat Res.** 6; 569(1-2):29-63. 2005.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. Divergent Roles of IRE1 $\alpha$  and PERK in the Unfolded Protein Response. **Current Molecular Medicine.** 6, 5-36, 2006.

SHEN X, ZHANG K, KAUFMAN RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. **J Chem Neuroanat.**; 28(1-2):79-92. 2004.

SHEN, J; SNAPP, E. L; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J; PRYWES, R. Stable Binding of ATF6 to BiP in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. **Mol Cell Biol.**; 25(3):921-32. 2005.

SHI Y, VATTEM KM, SOOD R, AN J, LIANG J, STRAMM L, WEK RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. **Mol Cell Biol.**; 18(12):7499-509. 1998.

SHINOHARA Y, IMAJO K, YONEDA M, TOMENO W, OGAWA Y, KIRIKOSHI H, *et al.* Unfolded protein response pathways regulate Hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 432, 326–332. 2013.

SILVA LRC and SOUZA AM. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes? **Rev Soc Bras Med Trop** 49(3):267-273, May-June, 2016.

SILVA PA, PEREIRA CF, DALEBOUT TJ, SPAAN WJ, BREDENBEEK PJ. An RNA pseudoknot is required for production of yellow fever virus subgenomic RNA by the host nuclease XRN1, **J. Virol.** , vol. 84 (pg. 11395-11406). 2010.

SIMONIN Y, VAN RIEL D, VAN DE PERRE P, ROCKX B, SALINAS S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. **PLoS Negl Trop Dis** 11(9): e0005821. 2017.

SIPS GJ, WILSCHUT J, SMIT JM. Neuroinvasive flavivirus infections. **Rev Med Virol**; 22:69-87. 2012.

SOLOMON T. Flavivirus encephalitis. *The New England Journal of Medicine*; 351: 370–378. 2004.

SONG H, MOSELEY PL, LOWE SL, OZBUN MA. Inducible heat shock protein 70 enhances HPV31 viral genome replication and virion production during the differentiation-dependent life cycle in human keratinocytes. **Virus Res.**; 147(1):113-22. 2010.

SOVOLYOVA N. *et al.* Stressed to death - mechanisms of ER stress-induced cell death. **Biological Chemistry** 395, 1–13. 2014.

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, da Semana Epidemiológica 45/2015 até a Semana Epidemiológica 02/2017. Boletim Epidemiológico. Volume 48 N° 6 –ISSN 2358-9450. 2017a.

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Boletim Epidemiológico. Volume 48 N° 3 - ISSN 2358-9450. 2017b.

Sheridan MA, Balaraman V, Schust DJ, T Ezashi, Roberts RM, Franz AWE. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. **PLoS ONE** 13 (7). 2018.

SHRESTHA B, WANG T, SAMUEL MA, WHITBY K, CRAFT J, FIKRIG E, *et al.* Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. **J Virol.** ,80(11):5338-48. 2006.

SIMPSON DI. Zika virus infection in man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**;58: 335-8. 1964.

- SIROHI D, CHEN Z, SUN L, KLOSE T, PIERSON TC, ROSSMANN MG, *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science.**, 5316:1-7. 2016.
- SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in sera of human beings residing in East Africa. **Journal of Immunology** 69, 223-34. 1952.
- SURASOMBATPATTANA P, HAMEL R, PATRAMOOL S, LUPLERTLOP N, THOMAS F, DESPRES P, BRIANT L, YSSEL H, MISSE D. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. **Infect Genet Evol** 11:1664–1673. 2011.
- TABAS I, RON D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat Cell Biol.**; 13(3):184-90. 2011.
- TAN Z, ZHANG W, SUN J, *et al.* ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells. **J Neuroinflammation.**;15(1):275. 2018.
- TAPPE D, RISSLAND J, GABRIEL M, *et al.* First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. **Euro Surveill**;19(4). 2014.
- TAPPE D, NACHTIGALL S, KAPAUN A, SCHNITZLER P, GÜNTHER S, SCHMIDT-CHANASIT J. Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. **Emerg Infect Dis**;21:911-3. 2015.
- TARDIF KD, MORI K, SIDDIQUI A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. **J Virol.** 76(15):7453-9. 2002.
- TARDIF KD, MORI K, KAUFMAN RJ AND SIDDIQUI A. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-Xbp-1 path way of the unfolded protein response. **J. Biol. Chem.** 279, 17158–17164. 2004.
- TARDIF KD, WARIS G AND SIDDIQUI A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. **Trends Microbiol.** 13, 159–163.2005.
- THEILIER M, CASALS J. The serological reactions in yellow fever. **AmJ Trop Med Hyg** 7:585–594. 1958.
- THOMAS, D. L. *et al.* Local Transmission of Zika Virus--Puerto Rico, November 23, 2015-January 28, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 6, p. 154–8, 19 fev. 2016.
- THUERAUF D. J., MARCINKO M. , BELMONT P. J. AND GLEMBOTSKI C.C. Effects of the Isoform-specific Characteristics of ATF6α and ATF6β on Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Expression and Cell Viability. **Journal of biological chemistry.** 282, 22865-22878. 2007.
- TOGNARELLI J, ULLOA S, VILLAGRA E, *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Arch Virol**; 161:665-8. 2016.
- TOTH A, NICKSON P, MANDL A, BANNISTER ML, TOTH K, ERHARDT P. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.** ;7(3):205-18. 2007.
- TRIPATHI S, BALASUBRAMANIAM VRMT, BROWN JA, *et al.* A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **Pierson TC, ed. PLoS Pathogens.** 13(3):e1006258. 2017.
- UMAREDDY I. *et al.* Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. **Virology Journal** 4, 91. 2007.
- URANO F, BERTOLOTTI A, RON D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. **J Cell Sci.**; 113 Pt 21():3697-702. 2000.
- VAN HUIZEN R, MARTINDALE JL, GOROSPE M, HOLBROOK NJ. P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. **J Biol Chem.** 2; 278(18):15558-64. 2003.
- VEKICH J.A., BELMONT P.J., THUERAUF D.J., GLEMBOTSKI, C.C. Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 53, pp. 259–267. 2012.
- VENTURA CV, MAIA M, BRAVO-FILHO V, GÓIS AL, BELFORT R JR. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **Lancet.** 2016;387:228.
- VILLORDO SM, GAMARNIK AV. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication, **Virus Res.**, vol. 139 (pg. 230-239). 2009.
- WELSCH S, MILLER S, ROMERO-REY I, MERZ A, BLECK CK, WALTHER P, *et al.* Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell Host Microbe** 5, 365–375.2009.

Comentário [AVS1]:

WANG Y, SHEN J, ARENZANA N, TIRASOPHON W, KAUFMAN RJ, PRYWES R. J. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. **Biol Chem.** Sep 1. 275(35):27013-20. 10.1074/jbc.M003322200. 2000.

WERNER ED, BRODSKY JL, MCCracken AA. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. **Proc Natl Acad Sci USA.** Nov 26;93(24):13797-801. 1996.

WHO - World Health Organization. uidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2007.

WHO - World Health Organization. Pacific syndromic surveillance report. Week 13, ending 30th March, 2014. World Health Organization Western Pacific Region, Manila, Philippines. 2014.

WHO - World Health Organizations. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. *Wkly Epidemiol Rec*, 91(7): p. 73–81. 2016a.

WHO - World Health Organizations. Testes de laboratório para a infecção pelo vírus Zika. 2016b.

WHO - World Health Organizations. WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 2016c.

WHO - World Health Organizations. Zika virus microcephaly and guillain-barré syndrome situation report 17 march 2016. 2016d.

World Health Organization (WHO). Assessment of infants with microcephaly in the context of Zika virus. 2016e.

WHO - World Health Organizations. Situation report - zika virus, microcephaly, guillain-barré syndrome, 2 february 2017. 2017.

WILEY, C. A., and CHIMELLI, L. Human Zika and West Nile virus neurological infections: What is the difference? *Neuropathology*, neup.12385. 2017.

WU SJ, GROUARD-VOGEL G, SUN W, *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med.** 2000; 6:816–820.

WU J, RUTKOWSKI DT, DUBOIS M, SWATHIRAJAN J, SAUNDERS T, WANG J, SONG B, YAU GD, KAUFMAN RJ. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. **Dev Cell.** 13(3):351-64. 2007.

XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, DAVIS RJ, GREENBERG ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science.**;270:1326–1331. 1995.

XU C, BAILLY-MAITRE B, REED JC . Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **J Clin Invest.**; 115(10):2656-64. 2005.

XU MY, LIUA SQ, DENG CL, ZHANGA QY, ZHANGA B. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods** 236 93–97. 2016.

YAN W, FRANK CL, KORTH MJ, SOPHER BL, NOVOA I, RON D, KATZE MG. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 10; 99(25):15920-5. 2002.

YAMAMOTO, K., T. SATO, *et al.* Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. **Developmental Cell**, v.13, n.3, Sep, p.365-76. 2007.

YANG H, LIU R, CUI Z, CHEN ZQ, YAN S, PEI H, LI B. Functional characterization of 58-kilodalton inhibitor of protein kinase in protecting against diabetic retinopathy via the endoplasmic reticulum stress pathway. **Mol Vis.** 10; 17():78-84. 2011.

YE J., RAWSON R. B., KOMURO R., CHEN X., DAVE U. P., PRYWES R., *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. **Mol. Cell.** 6, 1355–1364. 2000.

YOSHIDA, H; MATSUI,T; YAMAMOTO, A; OKADA, T; MORI, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v.107, n.7, Dec 28, p.881-91. 2001.

YOSHIDA H, MATSUI T, HOSOKAWA N, KAUFMAN RJ, NAGATA K, MORI K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. **Developmental Cell**, Vol. 4, 265–271. 2003.

YOSHIDA, H., M. OKU, *et al.* pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. **J Cell Biol**, v.172, n.4, Feb 13, p.565-75. 2006.

YU C.Y. *et al.* Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. **Journal of Virology** 80, 11868–11880. 2006.

YU M, ZHANG W, HOLDAWAY HA, LI L, KOSTYUCHENKO VA, CHIPMAN PR, KUHN RJ, ROSSMANN MG, CHEN J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science** 319, 1834–1837 (2008).

ZANLUCA C, DE MELO VCA, MOSIMANN ALP, DOS SANTOS GIV, DOS SANTOS CND, LUZ K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110:569-572. 2015.

ZHAN Q., LORD, K.A., ALAMO JR., I., HOLLANDER, M.C., CARRIER, F., RON, D., KOHN, K.W., HOFFMAN, B., LIEBERMANN, D.A., AND FORNACE JR., A.J. The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. **Mol. Cell. Biol.** 14: 2361-2371. 1994.

ZHANG Y, CORVER J, CHIPMAN PR, ZHANG W, PLETNEV SV, SEDLAK D, BAKER TS, STRAUSS JH, KUHN J, ROSSMANN M G, Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J.**, 22, 2604–2613. 2003.

ZHANG K, KAUFMAN RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. **Neurology**. 24; 66(2 Suppl 1):S102-9. 2006.

ZHANG L AND WANG A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Front Plant Sci.** 2012; 3: 293.2012.

ZHANG X, GE P, YU X, BRANNAN JM, BI G, ZHANG Q, SCHEIN S, ZHOU ZH. CRYO-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 20, 105–110. 2013.

ZHENG Y, GAO B, YE L, KONG L, JING W, YANG X, *et al.* Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. **J. Microbiol.** 43, 529–536. 2005.

ZINSZNER H, KURODA M, WANG X, BATCHVAROVA N, LIGHTFOOT RT, REMOTTI H, STEVENS JL, RON D. Chop is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes Dev.** 12:982–995. 1998.