

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

JÉSSICA PAULA LUCENA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTIVA DO VÍRUS ZIKA SOBRE  
HEPATÓCITOS E CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS EM ESTUDOS *IN VITRO*

Recife

2021

**JÉSSICA PAULA LUCENA**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTIVA DO VÍRUS ZIKA SOBRE  
HEPATÓCITOS E CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS EM ESTUDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Biociências e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Dr. Lindomar José Pena

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

RECIFE

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos  
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

---

- L935a Lucena, Jéssica Paula.  
Avaliação da capacidade infectiva do vírus Zika sobre hepatócitos e células estreladas hepáticas em estudos in vitro / Jéssica Paula Lucena. — Recife: [s.n.], 2021.  
106 p. : il. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.  
Orientadores: Sheilla Andrade de Oliveira, Lindomar José Pena, Danielle Maria Nascimento Moura.  
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. Infecção pelo vírus Zika - virologia. 2. Vírus Zika - metabolismo. 3. Hepatócitos - virologia. 4. Células Estreladas do Fígado. 5. Células Vero. 6. Fígado - virologia. 7. Células Hep G2. 8. Efeito Citopatogênico Viral. I. Oliveira, Sheilla Andrade de. II. Pena, Lindomar José. III. Moura, Danielle Maria Nascimento. III. Título.

**JÉSSICA PAULA LUCENA**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTIVA DO VÍRUS ZIKA SOBRE  
HEPATÓCITOS E CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS EM ESTUDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Biociências e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 28/04/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup> Sheilla Andrade de Oliveira

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>o</sup> Luydson Richardson Silva Vasconcelos

/Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup> Vláudia Maria Assis Costa

Centro de Ciências Médicas/Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a cada pessoa que ajudou  
a agregar um tijolinho na minha trajetória, por  
me ter ajudado na construção da pessoa que  
me tornei hoje.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente aos meus pais, que sempre se esforçaram pelo meu crescimento e aprendizado. Meu amor por vocês não cabe em palavras e me emociono simplesmente por estar escrevendo isso. Obrigada por essa família (Lucy também). Muito obrigada por absolutamente tudo. Esse trabalho também é de vocês. Ao restante da família que sempre me apoiou, meus avós, tios, primos, tanta gente que eu amo.

Às minhas orientadoras, Sheilla e Danielle, pelo apoio e pelas ideias, pela ajuda e pela oportunidade. Sou muito grata por participar desse grupo e por aprender tanto com vocês. Ao professor Lindomar, pela ajuda e por me apresentar a pessoas que me ensinaram muito no decorrer desse trabalho, Bárbara e Willyene.

Aos meus amigos de laboratório, Veruska, Miria, Carlinhos, Roni, Elane e principalmente à Alex e Cleo, que me ajudaram ativamente em vários momentos no decorrer desse trabalho e à Cícero e Juliana, por tanto apoio e conversa. Não poderia querer companhia melhor ao meu lado na bancada. Agradeço por tudo e por tanto.

À família que a vida me deu, meus amigos tão queridos, Yaucha, Fernanda, Luana, Gabriela N., Gabriela A., Júlia e Isabelle; Clênio, Klisman, Adson, Marina e Yeda, por ter caminhado comigo e segurando minha mão tantas vezes. À família que eu ganhei e amo tanto conviver, Diego e Iris (com menção honrosa à Lana, Nagini e Elza!), minha tropinha, eu sou extremamente agradecida ao universo por me permitir viver esse momento com vocês. Obrigado por me ajudar da edição das fotos de microscopia, Iris e perdão aos dois pela minha loucura durante essa rotina cansativa. Aos meus colegas de turma, que também trilharam esse mesmo caminho. Em especial à Catarina e Janderson, que eu levo até hoje e pretendo levar por muito tempo.

Ao Hospital Universitário Oswaldo Cruz, que me deu mais uma oportunidade de vivenciar a saúde pública, num recorte novo para mim, e um senso de propósito durante esse momento de pandemia tão complicado. À equipe técnica do laboratório central que tanto me escuta e me acompanha todos os dias, que trazem leveza à um trabalho tão difícil.

À Professora Christina Peixoto e à Karina Saraiva, que me ajudaram com a ultraestrutura que enriqueceu tanto esse trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Aggeu Magalhães, que por tanto tempo eu considerei minha casa, por ter me dado a oportunidade de produzir ciência ao lado de tantas histórias e pessoas incríveis, por dar esperança à tantos brasileiros e por ser referência para

tantas pessoas. Me sinto honrada por ter feito esse trabalho onde fiz, com as pessoas que me auxiliaram tanto. Obrigada pela infraestrutura e pelo suporte, questões imprescindíveis na viabilidade desse trabalho.

À todos que perguntaram em algum momento como eu estava quando me viram pensativa ou cansada. À todos que torceram por mim.

Todos vocês têm um lugarzinho reservado no meu amor. Muito obrigada.

Todo abismo é navegável a barquinhos de  
papel.

Guimarães Rosa



## RESUMO

LUCENA, Jéssica Paula. **Avaliação da capacidade infectiva do vírus Zika sobre hepatócitos e células estreladas hepáticas em estudos *in vitro***. 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

As doenças hepáticas crônicas, de diversas etiologias, têm em comum a inflamação crônica hepatocelular que pode levar ao desenvolvimento da fibrose. Por se tratar de morbidades com prevalência mundial, as hepatopatias crônicas são doenças de base em pacientes acometidos pelas mais variadas patologias, a exemplo de casos descritos de infecção por flavivírus com acometimento hepático ocorridos durante epidemias. O vírus Zika é um flavivírus e apesar de ter sido descrito pela primeira vez em 1947, tornou-se um problema de saúde pública devido a sua implicação na síndrome congênita e de Guillain-Barré. A patogênese viral e possíveis efeitos sinérgicos em comorbidades precisam ser elucidados. O objetivo desse trabalho foi avaliar se o ZIKV é infecta hepatócitos e células estreladas hepáticas, alterando o processo de reparo hepático. Para tal, as linhagens celulares GRX, LX-2, HepG2 e Vero foram infectadas por ZIKV na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. Na curva de crescimento viral *one step* foram observados as 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após infecção. A produção da progênie viral foi determinada por titulação pelo método de TCID<sub>50</sub> em células Vero. Também foi feita uma curva de viabilidade avaliando 24, 72 e 120 h após infecção, na qual foi observada perda de viabilidade severa nas linhagens HepG2 e LX-2. As GRX apresentaram 80% de sobrevivência após 120 h de infecção. A infecção foi confirmada através do Kit molecular ZDC. A citocina TGF- $\beta$ 1 foi quantificada pela técnica de ELISA em sobrenadante de cultura de células infectadas em diferentes intervalos, na qual foi observado aumento nas concentrações da citocina em todas as linhagens, com resposta mais expressiva nas células estreladas, cuja diferença já pôde ser observada a partir de 48 horas. Além disso, citocinas pró-inflamatórias foram quantificadas pela técnica de CBA e foi observada maior produção de IL-8 e IL-6 nas linhagens HepG2 e LX-2 após 2 e 4 dias de infecção, respectivamente. A citocina IL-6 não foi detectada na linhagem GRX, enquanto que IL-8 não demonstrou diferença entre infectada e controle. Na avaliação a nível ultraestrutural foi possível constatar alterações morfológicas, tais quais hipertrofia do retículo endoplasmático associado a vesículas contendo partículas virais e rearranjo dos microtúbulos, avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. Além da presença de autofagossomos e corpos lamelares nas células infectadas. Os achados desse trabalho permitem concluir que o ZIKV é capaz de infectar as linhagens avaliadas, causar alterações celulares e levar à perda da viabilidade celular nas linhagens HepG2 e LX-2. A linhagem GRX mostrou-se permissiva à infecção e resistente ao estresse. A infecção viral foi capaz de influenciar o processo de fibrogênese, estimulando da produção de citocinas pró-fibrogênicas e pró-inflamatórias, sugerindo que esse vírus é capaz de descompensar patologias pré-estabelecidas.

**Palavras-chave:** Infecção pelo vírus Zika; Reparo hepático; Efeito citopático, viral.

## ABSTRACT

LUCENA, Jéssica Paula. **Evaluation of the infective capacity of Zika virus on hepatocytes and hepatic stellate cells in *in vitro* studies.** 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Chronic liver diseases are caused by several etiologies, which have in common hepatocellular inflammation and the development of liver fibrosis. Because they are morbidities with worldwide prevalence, chronic liver diseases are underlying diseases in patients with various clinical conditions. During the epidemics of arboviruses, cases of flavivirus infection with hepatic impairment were described. The Zika virus (ZIKV) belongs to the genus flavivirus, as does the Yellow Fever and Dengue virus. Although first described in 1947, it has become a major public health problem due to its association with microcephaly and Guillain-Barré Syndrome. Questions regarding pathogenesis and possible synergistic effects on comorbidities need to be clarified. The present project aims to evaluate whether ZIKV infects hepatocytes and stellate liver cells and alters the liver repair process. For this, GRX, LX-2, HepG2 and Vero (as control) were cultured and infected by ZIKV at the multiplicity of infection (MOI) of 0,1. One-step viral growth curves were performed, at intervals of 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours after infection. The production of the viral progeny was determined by titration using the TCID<sub>50</sub> method in Vero cells. Cell viability of 24, 72 and 120 hours post infection was assessed with the microplate XTT technique, read on a spectrophotometer, in which was observed severe viability loss in HepG2 and LX-2 cells, with 40% survival after 120 hours. GRX cells showed 80% survival after same period. The infection was confirmed using the ZDC Molecular Kit. TGF- $\beta$ 1 cytokine was quantified by ELISA technique in infected cells culture media in different intervals, in which was founded higher levels in all evaluated lineages, with a more expressive response in the hepatic stellate cells, with 48 hours post infection. Moreover, proinflammatory cytokines were quantified by CBA, in which was observed that HepG2 and LX-2 infected cells produced higher levels of IL-6 and IL-8, after 2- and 4-days post infection, respectively. IL-6 was not detected in GRX cells and IL-8 doesn't have showed any difference between infected and control group. In ultrastructural analysis, it was observed morphological changes, such as endoplasmatic reticulum hypertrophy associated to vesicular bodies containing viral particles, seen by transmission electron microscopy. Furthermore, the presence of autophagosomes and lamellar bodies was founded in infected cells. These findings allow us to conclude that ZIKV is able to infect the evaluated cell lineages, leading to morphological changes and viability loss in HepG2 and LX-2 cells. GRX cells have showed to be permissive to infection but resistant to stress. Moreover, we can conclude that ZIKV infection can affect the fibrogenesis process, through production stimuli of profibrogenic and proinflammatory cytokines, suggesting that ZIKV may cause disbalance pre-established pathologies in patients with liver diseases.

**Keywords:** Zika virus infection, Liver regeneration, Cytopathogenic effect, viral.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição geográfica de morbidade hospitalar do SUS por local de internação no Brasil.....	17
<b>Figura 2</b> - A evolução da doença hepática crônica.....	20
<b>Figura 3</b> - Desenho esquemático do Espaço de Disse.....	22
<b>Figura 4</b> - Iniciação e perpetuação do fenótipo ativado das CEHs.....	23
<b>Figura 5</b> - O Vírus Zika.....	26
<b>Figura 6</b> - Difusão espacial dos casos de microcefalia no Brasil, 2015-2016.....	29
<b>Figura 7</b> - Sintomas da infecção causada pelo vírus Zika.....	30
<b>Figura 8</b> - Curva de crescimento <i>one-step</i> do ZIKV nas linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX.....	43
<b>Figura 9</b> - Linhagens celulares infectadas por ZIKV e controles (MOCK) nos intervalos de 1, 3 e 5 dias após a infecção.....	45
<b>Figura 10</b> - Ultraestrutura das células Vero.....	47
<b>Figura 11</b> - Ultraestrutura das células HepG2.....	48
<b>Figura 12</b> - Ultraestrutura das células LX-2.....	49
<b>Figura 13</b> - Ultraestrutura das células GRX.....	50
<b>Figura 14</b> - Curva temporal de viabilidade após infecção pelo ZIKV nas linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX.....	51
<b>Figura 15</b> - Ensaio de viabilidade celular após infecção pelo ZIKV nas linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX.....	52
<b>Figura 16</b> - ELISA sanduíche da citocina TGF- $\beta$ 1 na linhagem HepG2.....	54
<b>Figura 17</b> - ELISA sanduíche da citocina TGF- $\beta$ 1 na linhagem LX-2.....	55
<b>Figura 18</b> - ELISA sanduíche da citocina TGF- $\beta$ 1 na linhagem GRX.....	56
<b>Figura 19</b> - Dosagem de IL-6 e IL-8 nas linhagens LX-2 e HepG2.....	58
<b>Figura 20</b> - Dosagem de IL-6 e IL-8 na linhagem GRX.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Actina de Músculo Liso
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>BCRJ</b>	Banco de Células do Rio de Janeiro
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
<b>CEH</b>	Célula Estrelada Hepática
<b>CPE</b>	Efeito citopático
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>DATASUS</b>	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
<b>DENV</b>	Virús da Dengue
<b>DMEM</b>	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DPI</b>	Dias após infecção
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>HBC</b>	Virús da Hepatite C
<b>HBSS</b>	Solução Salina Balanceada de Hank
<b>HBV</b>	Virús da Hepatite B
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>IFN<math>\alpha/\beta</math></b>	Interferon $\alpha/\beta$
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MMP</b>	Metaloproteinases
<b>PBS</b>	Solução Fosfato Salina
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia Polimerase
<b>PDGF</b>	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
<b>RESP</b>	Registro de eventos de saúde pública
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	PCR Transcriptase Reversa
<b>RT-qPCR</b>	PCR quantitativa ou PCR em Tempo Real
<b>SBF</b>	Soro Fetal Bovino

<b>SCZ</b>	Síndrome congênita relacionada à infecção pelo ZIKV
<b>SGB</b>	Síndrome de Guillain-Barré
<b>SV40</b>	Vírus Vacuolante Símio 40
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCID50</b>	Dose Infectiva em 50% da cultura de tecidos
<b>TGF-β1</b>	Fator de Crescimento e Transformação-β1
<b>TIMP</b>	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose Tumoral-α
<b>XTT</b>	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
<b>ZIKV</b>	Vírus Zika
<b>ZDC</b>	Zika, Dengue e Chikungunya

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	16
2.1	EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS HEPÁTICAS .....	16
2.2	PATOGENIA DAS DOENÇAS HEPÁTICAS.....	18
<b>2.2.1</b>	<b>Fibrogênese hepática</b> .....	19
<b>2.2.2</b>	<b>Células Estreladas Hepáticas</b> .....	21
<b>2.2.3</b>	<b>Coinfecções na doença hepática</b> .....	24
2.3	VÍRUS ZIKA.....	26
<b>2.3.1</b>	<b>Epidemiologia do ZIKV</b> .....	27
<b>2.3.2</b>	<b>Fisiopatologia do ZIKV</b> .....	30
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	33
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
5.1	OBJETIVO GERAL.....	34
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>6</b>	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	35
6.1	CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES.....	35
<b>6.1.1</b>	<b>HepG2</b> .....	35
<b>6.1.2</b>	<b>LX-2</b> .....	35
<b>6.1.3</b>	<b>GRX</b> .....	36
<b>6.1.4</b>	<b>Vero</b> .....	36
6.2	ESTOQUE VIRAL.....	36
6.3	ENSAIO DE PLACA TCID50.....	36
6.4	ULTRAESTRUTURA.....	37
<b>6.4.1</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão</b> .....	37
6.5	ENSAIO DE VIABILIDADE.....	38
6.6	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS.....	38
<b>6.6.1</b>	<b>CBA</b> .....	38
<b>6.6.2</b>	<b>ELISA</b> .....	39
6.7	ENSAIOS MOLECULARES.....	39
<b>6.7.1</b>	<b>Extração de RNA total</b> .....	39

6.7.2	<b>RTPCR</b> .....	40
6.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	41
8	<b>RESULTADOS</b> .....	42
8.1	AS LINHAGENS CELULARES HEPG2, GRX E LX-2 SÃO PERMISSIVAS A INFECÇÃO PELO ZIKV .....	42
8.1.1	<b>Replicação viral nas linhagens celulares</b> .....	42
8.1.2	<b>Efeito citopático</b> .....	44
8.1.3	<b>Quantificação da carga viral</b> .....	46
8.1.4	<b>Análise ultraestutural</b> .....	47
8.2	A INFECÇÃO PELO ZIKV DIMINUI A VIABILIDADE DAS LINHAGENS CELULARES HEPG2, GRX E LX-2.....	50
8.2.1	<b>Ensaio de XTT</b> .....	50
8.3	A INFECÇÃO PELO ZIKV ALTERA VIAS DE IMUNOMODULAÇÃO DO REPARO HEPÁTICO NAS LINHAGENS CELULARES HEPG2 E LX- 2.....	53
8.3.1	<b>Citocina profibrogênica TGF-β1</b> .....	53
8.3.2	<b>Citocinas inflamatórias</b> .....	57
9	DISCUSSÃO.....	60
10	CONCLUSÕES.....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA “PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

As hepatopatias crônicas são um problema de saúde pública em todo o mundo, ocasionadas por diversas etiologias, principalmente as hepatites virais, hepatite autoimune, abuso de álcool e esteato-hepatite não-alcoólica (BATALLER; BRENNER, 2005). Essas enfermidades têm em comum a inflamação e/ou necrose hepatocelular que pode levar ao desenvolvimento da fibrose hepática. Esta última, é inicialmente uma resposta fisiológica aos estímulos agressivos, servindo de sustentação vascular (ANDRADE, 2005), todavia a permanência do estímulo agressor leva à deposição excessiva de matriz extracelular prejudicando a homeostase hepática (POPOV; SCHUPPAN, 2009). As células estreladas hepáticas (CEHs) são a principal fonte de matriz extracelular nesse processo. As CEHs são células perisinusoidais residentes, encontradas no espaço de Disse, que, durante a lesão hepática, são ativadas pelo microambiente inflamatório a um fenótipo pró-fibrogênico e contrátil (REEVES; FRIEDMAN, 2002).

Alguns estudos descreveram a capacidade de infecção das células estreladas por vírus da hepatite B (VHB) (NORTON et al., 2004; MARTÍN- VÍLCHEZ et al., 2008 GUO et al., 2009; XUAN et al., 2009) e resultados obtidos em experimentos *in vitro* demonstraram que as CEHs têm sua proliferação aumentada quando infectadas pelo VHB, nos quais é possível observar a superexpressão de fatores envolvidos na fibrogênese hepática a exemplo do RNAm de colágeno tipo I (XUAN et al., 2009), da expressão da citocina TGF- $\beta$  (GUO et al., 2009) e da expressão de fibronectina (NORTON et al., 2004).

Na literatura, já foram descritas mudanças no tecido hepático durante uma infecção por flavivírus, tais como infiltração leucocitária, esteatose e edemas intracelulares (CHEN et al., 2016; SAKINAH et al., 2017). Esses efeitos estão relacionados tanto à toxicidade viral quanto à reação imune em resposta à infecção.

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae* e foi primeiramente isolado em 1947 na floresta Zika, em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). É responsável por uma doença na qual os indivíduos infectados apresentam sintomas moderados semelhantes às demais arboviroses. Apesar disso, a infecção por ZIKV tornou-se um grande problema de saúde pública devido ao recente surto no continente americano, onde se verificou complicações neurológicas em adultos – a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e encefalite (UGARTE et al., 2017), além da microcefalia e anormalidades oculares decorrentes de infecção congênita em neonatos (COSTA et al., 2016).



O ZIKV pode ser transmitido de forma vetorial por mosquitos, no Brasil mais especificamente pela espécie *Aedes aegypti* e, potencialmente, pelo *Culex quinquefasciatus* (GUEDES et al., 2017). Também já foram descritas transmissões por vias sexual e vertical, sendo esta última a responsável pelos casos de microcefalia relatados no Brasil em 2016. A inédita associação da microcefalia a infecção pelo ZIKV trouxe um desafio às autoridades de saúde que tiveram que se adaptar em curto tempo a prestar assistência às diferentes necessidades das famílias. Isso vem gerando um grande custo, uma vez que maioria dos casos registrados foram descritos nas regiões mais pobres do país (SLAVOV et al., 2016).

Trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar a relação da infecção pelo ZIKV e os efeitos neuropatológicos, porém muito progresso ainda pode ser feito. Estudos apontam a ocorrência de anormalidades patológicas devido a infecção viral em múltiplos órgãos, como fígado, pulmões e rins (SOUSA et al., 2017). Estudos *in vitro* relataram que hepatócitos são capazes de ser infectadas por *flavivírus* acarretando na produção de citocinas próinflamatórias (LANG et al., 2016; TRICOT et al., 2018; WOODSON et al., 2011).

Esse estudo buscou observar se ZIKV pode infectar hepatócitos e CEHs e avaliar as implicações dessa infecção em fatores envolvidos no processo de reparo hepático. Com isso, espera-se acrescentar conhecimentos necessários ao envolvimento do vírus Zika em coinfeções em morbidades hepáticas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL

Atuando na manutenção da homeostase, o fígado recebe um grande aporte sanguíneo e possui diversas funções no organismo, como produzir proteínas séricas e bile, manter os níveis de glicose sanguínea (através da glicogênese, glicogenólise e gliconeogênese) e o metabolismo de xenobióticos pela detoxificação (KIETZMANN, 2017). Principalmente devido a esta última função, o fígado torna-se um órgão susceptível a diversos tipos de lesão.

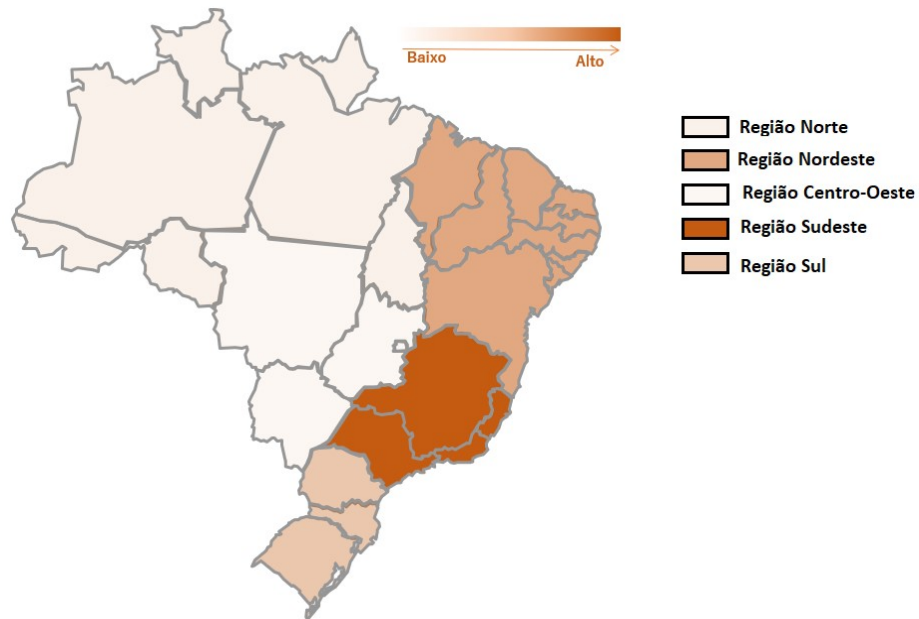
As hepatopatias crônicas são caracterizadas pela presença de estímulos agressores persistentes ao órgão, que estimulam uma resposta cicatricial - o processo fibrogênico, e pode acarretar em cirrose ou insuficiência hepática (SEKI & SCHWABE, 2015). A avaliação do ônus decorrente das hepatopatias crônicas pode ser particularmente difícil, tendo em vista que se trata de quadros clínicos caracterizados por danos contínuos e longos períodos de latência. Os pacientes costumam procurar ajuda médica apenas em estágios clínicos avançados, quando os sintomas hepáticos surgem (BELL et al., 2008). Os métodos diagnósticos incluem biópsia, considerada como padrão-ouro, no entanto é um método invasivo e possui algumas limitações quanto à acurácia como variações no tamanho da amostra. Além disso, alguns métodos não invasivos podem ser empregados, como ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética (SHARMA et al., 2014).

### 2.1. EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS HEPÁTICAS CRÔNICAS

Apesar de se tratar de um problema de saúde pública mundial, as doenças hepáticas crônicas ainda são negligenciadas, com taxa de mortalidade estimada de 2 milhões de mortes por ano no mundo (MARCELLIN & KUTALA, 2018). A cirrose hepática descompensada é responsável por cerca de 170.000 de mortes por ano na Europa, sendo a principal causa do transplante hepático e fator de risco no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) (PAROLA et al., 2018).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, dados disponíveis no DATASUS do Sistema de Internações Hospitalares do SUS totalizaram 817.881 internações em todo o Brasil, no período de 12 anos compreendido entre janeiro de 2008 a janeiro de 2020, referentes aos termos ‘doença alcoólica do fígado’, ‘hepatite aguda B’, ‘outras hepatites virais’, ‘esquistossomose’ e ‘outras doenças do fígado’ (Figura 1) (BRASIL, 2020).

**Figura 1:** Distribuição geográfica de morbidade hospitalar do SUS por local de internação no Brasil.



**Fonte:** Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

**Nota:** De acordo com dados disponíveis no DATASUS TabNet, durante o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2020 ocorreram 817.881 internações (compreendendo o sistema público e privado) referentes aos termos ‘doença alcoólica do fígado’, ‘hepatite aguda B’, ‘outras hepatites virais’, ‘esquistossomose’ e ‘outras doenças do fígado’ da Classificação Internacional de Doenças-10 (CID-10). Essas internações estão distribuídas em 69.954 casos na região Norte, 203.685 na região Nordeste, 345.492 na região Sudeste, 146.714 na região Sul e 52.036 na região Centro-Oeste.

Entre as doenças hepáticas crônicas, o uso abusivo de álcool é a principal causa de mortalidade relacionada ao fígado no ocidente, geralmente decorrente de insuficiência hepática ou cirrose (STEIN et al., 2016). O consumo de bebidas alcoólicas é considerado um fator de risco “dose-dependente” para diversas doenças (PIMPIN, 2018). Quanto às hepatites virais B e C, a maioria dos casos está distribuída na Ásia e na África Subsaariana. As complicações decorrentes da hepatite C são responsáveis por cerca de 700.000 mortes anualmente, enquanto que a hepatite B, por aproximadamente 600.000 mortes (ROWE, 2017). Já a hepatite autoimune, é uma doença hepática relativamente rara, caracterizada por altos níveis de IgG e autoanticorpos circulantes (GATSELIS, 2015). Suas causas ainda não foram elucidadas, porém, é mais comum em mulheres (AIZAWA & HOKARI, 2017), assim como outras doenças autoimunes.

A esteato-hepatite não-alcoólica (NASH – *non alcoholic steatohepatitis*) é prevalente no mundo todo e vem emergindo com o sedentarismo e a popularização de hábitos alimentares ocidentais, como o *fast food* (YU et al., 2018). No entanto, além dos fatores ambientais, a NASH também é decorrente de fatores genéticos e metabólicos, podendo estar

associada a doenças cardiovasculares, diabetes e síndrome metabólica (YOUNOSSI et al., 2016). Além disso, a lesão hepática é uma das reações adversas mais comuns associadas ao uso de medicamentos. A exposição prolongada a compostos hepatotóxicos é responsável por altos índices de morbidade (TOMLINSON et al., 2019).

O desenvolvimento de doença crônica no fígado também pode ser decorrente da infecção pelo parasito *Schistosoma mansoni*. Este é responsável pela esquistossomose mansônica, uma parasitose tropical e negligenciada, endêmica e de interesse de saúde pública no Brasil. As manifestações crônicas incluem a fibrose e hipertensão periportal no fígado, decorrente da reação granulomatosa em resposta à deposição de ovos (NELWAN, 2019). Em 2015 foi estimado que 252 milhões de pessoas estariam infectadas no mundo, enquanto que em 2016, 10,1 milhões de mortes foram atribuídas à esquistossomose (SILVA-MORAES et al., 2019; GBD, 2016). No Brasil, a esquistossomose mansônica é endêmica em 19 dos 27 estados (NASCIMENTO et al., 2019).

## 2.2. PATOGENIA DAS DOENÇAS HEPÁTICAS

O fígado é composto por um tipo de célula parenquimal, os hepatócitos, e por células não parenquimatosas, como as células endoteliais, células epiteliais biliares, células de Kupffer (macrófagos residentes), linfócitos intra-hepáticos, células progenitoras ovais, colangiócitos e as células estreladas hepáticas (CEHs) (DENG et al., 2018). Os hepatócitos constituem aproximadamente 80% da população total de células hepáticas e são responsáveis pelas funções metabólicas do fígado (GAO et al., 2008).

Diferente de outros tipos celulares, os hepatócitos não estão ligados a uma lâmina basal firme, e sim cercados por MEC de baixa densidade contendo fatores de crescimento e proteínas secretadas por outras populações celulares (GISSSEN et al., 2015). Essa ausência de lâmina basal facilita a troca de macromoléculas entre o lúmen dos sinusoides e o parênquima. Dessa forma, durante o processo de lesão hepática, os hepatócitos são as principais células comprometidas, pois estão continuamente expostos a metabólitos, nutrientes, hormônios e diferentes gradientes de oxigênio (KIETZMANN, 2017).

O termo ‘hepatite’ se refere ao processo inflamatório decorrente do dano hepático. Esta pode ser caracterizada como aguda ou crônica, de acordo com o tempo de persistência do estímulo inflamatório, se este é um curto ou longo período, acarretando em lesões limitadas ou progressivas, respectivamente. Na análise morfológica, a hepatite aguda apresenta áreas de necrose e inflamação, enquanto que no quadro crônico, esses achados costumam estar

acompanhados de fibrose (NEGASH & GALE, 2015). No geral, a hepatite é um resultado da ação de células hepáticas em resposta a um patógeno e/ou metabólito.

A morte celular dos hepatócitos leva a um processo inflamatório e, portanto, capaz de exercer estímulo pró-fibrogênico, que se relaciona diretamente à fibrose e à severidade do quadro clínico (ALTAMIRANO-BARRERA et al., 2017). O dano hepatocelular acarreta na liberação de corpos apoptóticos, fragmentos de DNA e espécies reativas de oxigênio. Em casos específicos de lesão decorrente de infecção viral, as partículas virais liberadas pela morte dos hepatócitos infectados também geram uma resposta inflamatória (RACANELLI et al., 2006). Além de citocinas, as células de Kupffer secretam quimiocinas, que atraem os leucócitos da corrente sanguínea e CEHs para o local de lesão (YANG et al., 2016).

Em resposta ao dano celular, a depender do tipo de estímulo agressor, os hepatócitos remanescentes reentram no ciclo celular, proliferam e recompõem a massa e função hepática, porém, essa regeneração é atenuada durante a fibrogênese, principalmente devido aos componentes da MEC cicatricial. A MEC fornece o suporte de adesão para proliferação de hepatócitos, portanto alterações em sua composição e o acúmulo desta no espaço de Disse acarretam a distorção da arquitetura hepática e o funcionamento atípico dos hepatócitos (GISSEN et.al., 2015).

### **2.2.1. Fibrogênese hepática**

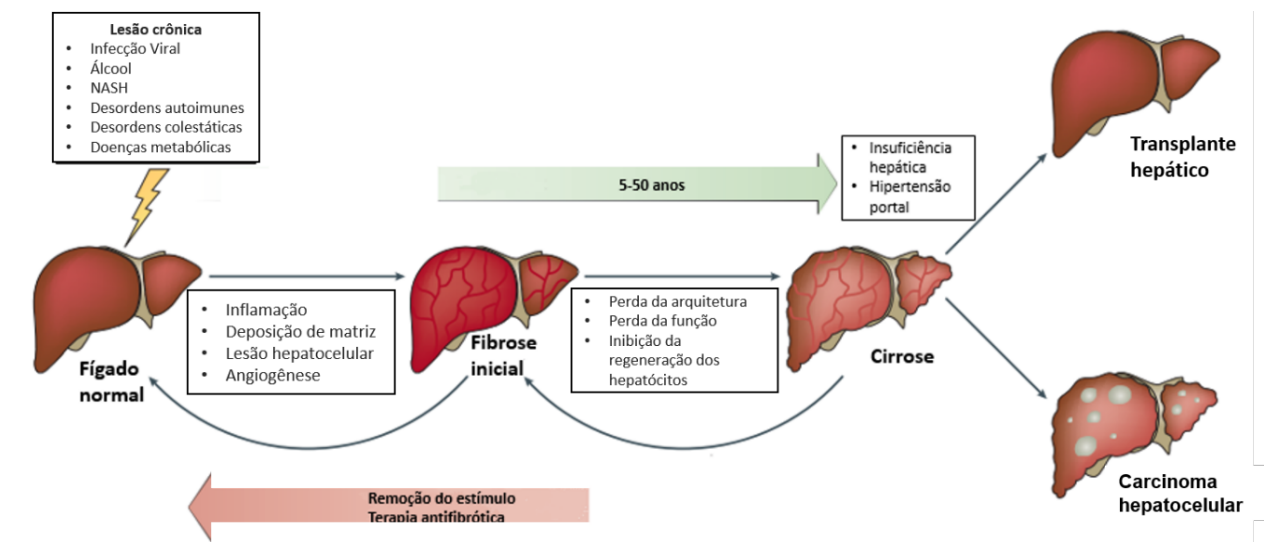
As hepatopatias crônicas são caracterizadas por lesões contínuas ao parênquima – principalmente aos hepatócitos e colangiócitos. A persistência de uma lesão hepática causa a inflamação crônica, que estimula uma resposta de reparo que envolve regeneração e cicatrização progressiva (BAIOCCHINI et al., 2016). A cicatrização é um processo complexo e a progressão desse quadro pode levar ao acúmulo de tecido cicatricial no órgão e, por conseguinte, à fibrose hepática (PAROLA et al., 2018).

Células apresentadoras de antígeno residentes no fígado (células de Kupffer, células endoteliais do sinusoides hepáticos e células dendríticas) são recrutadas ao local de lesão, onde fagocitam células apoptóticas e/ou antígenos que podem passar pelo fígado e secretam citocinas próinflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (PELLICORO et al., 2014). Após o estímulo, células de Kupffer (e hepatócitos, em menor proporção) liberam citocinas que promovem o recrutamento de células da resposta imune inata para o local de lesão (RACANELLI et al., 2006).

Os estímulos inflamatórios levam à resposta cicatricial (*wound healing*), que é a responsável pela alta capacidade do fígado de se adaptar à lesão (WANG et al., 2017b). Essa resposta consiste em deposição de matriz extracelular de tecido conjuntivo no local de lesão na tentativa de conter o dano (POPOV; SCHUPPAN, 2009). Inicialmente, esse mecanismo é favorável ao organismo, pois fornece sustentação vascular ao órgão durante a evolução do quadro clínico. Porém, o acúmulo e a alteração dos componentes da MEC inibem a proliferação dos hepatócitos (ZOUBEK et al., 2017; LUEDDE et al., 2014).

A fibrose hepática contínua é um quadro determinante para o desenvolvimento da doença hepática crônica (Figura 2) e do microambiente inflamatório, contendo debris celulares, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1, PDGF) levam à ativação das células estreladas hepáticas (YOON; FRIEDMAN; LEE, 2016).

**Figura 2:** A evolução da doença hepática crônica.



**Fonte:** Adaptado de PELLICORO et al., 2014.

**Nota:** A fibrose hepática é uma resposta cicatricial a estímulos contínuos, de diversas causas, a exemplo das hepatites virais/autoimunes, uso de álcool e/ou medicamentos, NASH, desordens colestáticas, doenças metabólicas. A lesão crônica acarreta na inflamação decorrente da lesão hepatocelular, deposição de matriz em locais de lesão e angiogênese. A fase de fibrose inicial é caracterizada pela perda da arquitetura hepática, perda gradual da função e pela inibição da regeneração dos hepatócitos, o que pode evoluir para a cirrose, na qual ocorre a insuficiência hepática e hipertensão portal. Os possíveis destinos são a resolução através do transplante hepático ou a evolução do quadro para o carcinoma hepatocelular.

Atualmente, a única terapia disponível para casos avançados de doença hepática é o transplante de fígado. Porém, trata-se de um procedimento laborioso e invasivo, que depende da disponibilidade de órgãos no sistema de saúde e do uso crônico de imunossupressores pelo paciente (PELLICORO et al., 2014). A busca por alternativas terapêuticas levou à ascensão

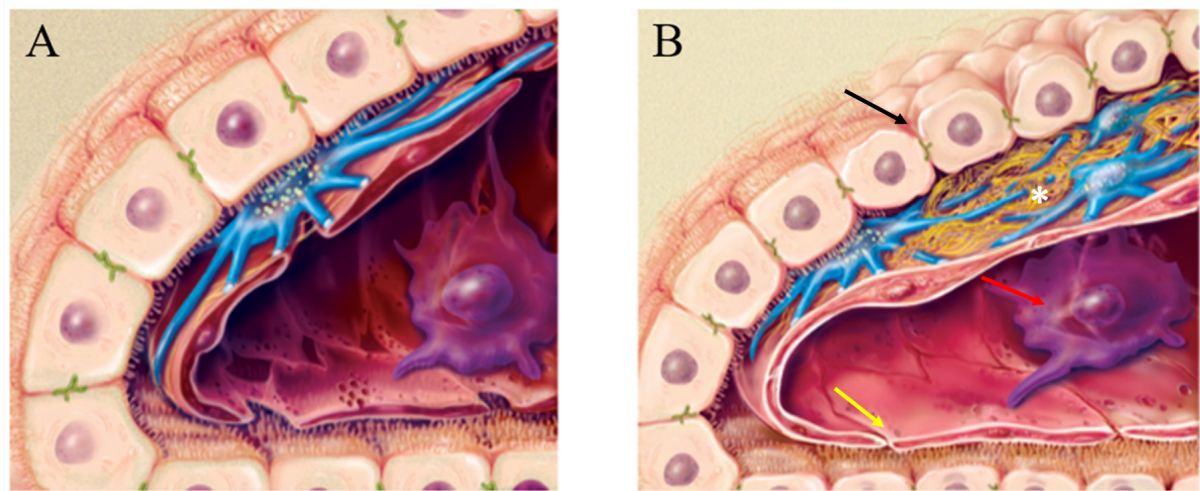
de pesquisas acerca de terapias antifibróticas, como a terapia com citocinas antifibróticas, através da terapia celular ou lipossomas, o bloqueio do efeito de citocinas fibróticas, como TGF- $\beta$ 1, entre outras (SCHON et al., 2016).

### **2.2.2. Células Estreladas Hepáticas**

As células estreladas hepáticas (CEHs), também conhecidas como células de Ito ou lipócitos, constituem cerca de 10% da população de células do fígado. As CEHs são células não parenquimatosas perisinusoidais residentes, encontradas no espaço de Disse, entre a superfície basolateral da trave de hepatócitos e o lado anti-luminal das células endoteliais sinusoidais (PUCHE et al., 2013). Quando quiescentes, as CEHs são responsáveis por manter a homeostase, armazenar vitamina A e retinoides em depósitos lipídicos intracelulares e, em menor proporção, detoxificação. Essas células são a principal fonte de matriz extracelular cicatricial durante a fibrogênese.

Durante a lesão hepática, o microambiente inflamatório, contendo citocinas e hormônios secretados tanto pelas células residentes (células de Kupffer, hepatócitos, células epiteliais biliares, células epiteliais sinusoidais), quanto pelas células recrutadas ao local de lesão, vai mediar a ativação das CEHs (Figura 3) (TRAUTWEIN et al., 2015). Quando ativadas, as CEHs passam por mudanças e adquirem um fenótipo semelhante a fibroblastos ou miofibroblastos. Essa diferenciação consiste principalmente em duas etapas: iniciação e perpetuação. Durante a iniciação, as células que foram ativadas por estímulos parácrinos sofrem alterações genótípicas que as deixam mais susceptíveis aos estímulos da segunda etapa, além de passar por mudanças fenotípicas precoces (TSUCHIDA & FRIEDMAN, 2017).

**Figura 3:** Desenho esquemático do Espaço de Disse.



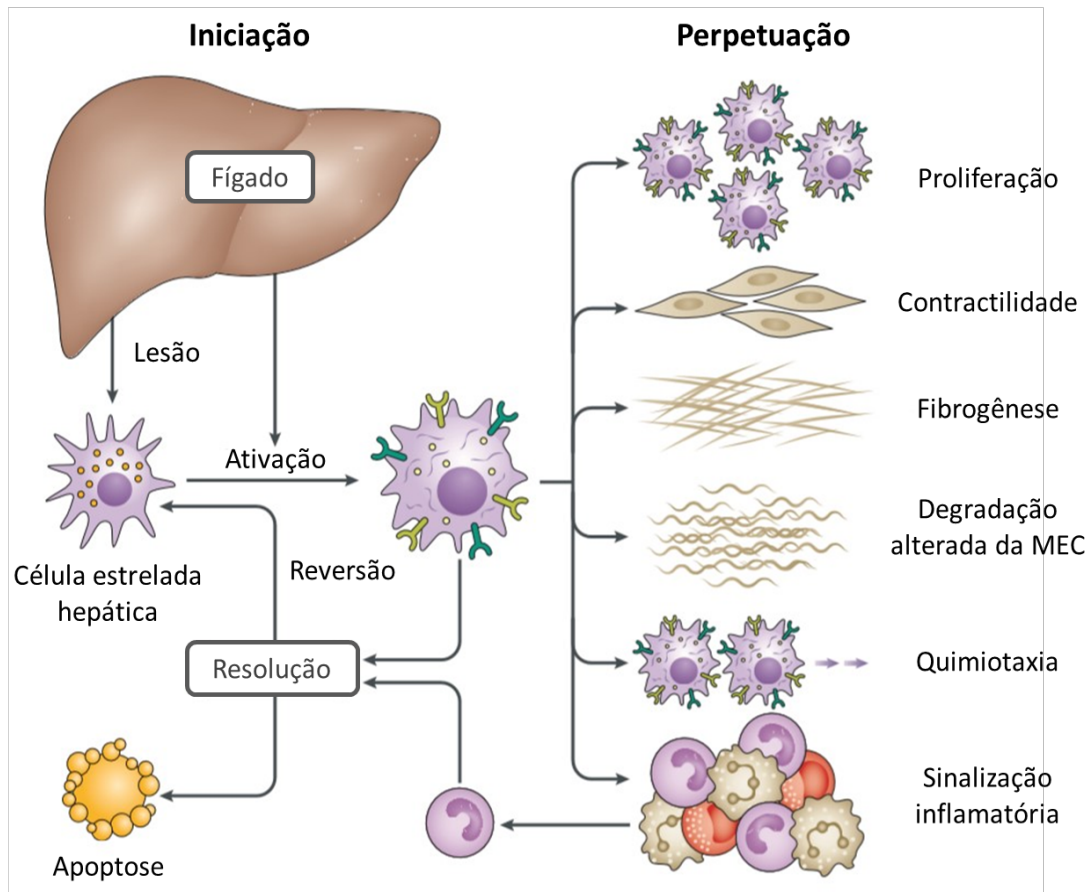
**Fonte:** Adaptado de FRIEDMAN & ARTHUR, 2002.

**Nota:** As células estreladas hepáticas encontram-se entre a trave de hepatócitos e o endotélio dos sinusoides. (A) No fígado normal, as macromoléculas são transportadas do lúmen do sinusóide para o parênquima através das fenestras do epitélio sinusoidal. (B) Durante o dano, os hepatócitos são lesionados e perdem suas vilosidades (seta preta) e o epitélio perde suas fenestras (seta amarela), ativando as células de Kupffer (seta vermelha), que secretam citocinas e quimiocinas, que atraem leucócitos da corrente sanguínea. O microambiente inflamatório vai ativar as células estreladas, que passam a secretar componentes de matriz extracelular e proliferar (asterisco).

No estágio de perpetuação do fenótipo ativado (Figura 4), as CEHs perdem seus depósitos lipídicos e adquirem potencial contrátil (responsável pelo perfil “miofibroblasto-*like*”), devido principalmente ao aumento na expressão de filamentos intermediários do citoesqueleto, como  $\alpha$ -SMA e desmina. Também ganham capacidade proliferativa acentuada, mediada principalmente por PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) e se tornam capazes de migrar para os locais de lesão (FRIEDMAN, 2008).



**Figura 4:** Iniciação e perpetuação do fenótipo ativado das CEHs.



**Fonte:** Adaptado de TSUCHIDA & FRIEDMAN, 2017.

**Nota:** A lesão hepática inicia a transdiferenciação das células estelares hepáticas quiescentes para o fenótipo semelhante a miofibroblastos. A etapa de perpetuação é caracterizada por mudanças fenotípicas relacionadas ao aumento na proliferação, contractilidade, fibrogênese (produção de componentes da MEC), degradação alterada da MEC, quimiotaxia e na sinalização inflamatória. A resolução desse processo, que pode acontecer após a retirada do estímulo primário, pode acontecer através da reversão, na qual a célula ativa retorna ao fenótipo quiescente, ou apoptose celular.

As CEHs passam a produzir componentes de MEC em maior proporção, devido à ação do TGF- $\beta$ 1 (NAVARRO-CORCUERA, 2019), o principal mediador do fenótipo ativado. Já foi descrito que ocorrem alterações importantes da MEC durante a progressão da fibrose. Seu conteúdo, inicialmente de colágeno tipo IV, proteoglicanos e laminina, torna-se majoritariamente composto por colágeno fibrilar tipo I e III, aumentando a densidade e rigidez da MEC, gerando estímulo mecânico para ativação de CEHs (WELLS, 2008).

A degradação da matriz extracelular é de responsabilidade das enzimas Metaloproteinases (MMPs), cuja ação biológica é inibida pelos Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Ambos são secretados pelas CEHs e células de Kupffer; e se mantém em equilíbrio para remodelamento da matriz. Durante a perpetuação das CEHs, além da produção de componentes da MEC, também é aumentada a expressão de TIMPs

(IREDALE; FALLOWFIELD, 2017). O quadro de desequilíbrio entre a produção e degradação de matriz é o principal responsável pelo seu acúmulo, característico da fibrose.

Durante o processo fibrogênico decorrente de infecções virais, o principal estímulo da resposta cicatricial são as espécies reativas de oxigênio decorrente da infecção e da necrose dos hepatócitos (PAROLA et al, 2018). No entanto, o HBV e o HCV são vírus não citopáticos em hepatócitos e a lesão tecidual é mediada pela resposta do hospedeiro. Com o tempo, essa resposta torna-se insuficiente, levando à infecção crônica e resposta inflamatória persistente. Além disso, apesar de não infectar as CEHs, algumas proteínas não estruturais (NS3 e NS5) do HCV são capazes de estimular diretamente a ativação das CEHs, de forma profibrogênica (BOTTCHEER et al, 2017; GUIDOTTI et al., 2006).

### **2.2.3. Coinfecções na doença hepática crônica**

A grande maioria dos estudos acerca de coinfecções com hepatites virais foram feitos com o HIV, tendo em vista que esses vírus compartilham rotas de transmissão (sexual, vertical e parenteral) (EASTERBROOK et al., 2016). Nesses casos, é observada progressão acelerada da doença hepática e maiores taxas de mortalidade (CHEW et al., 2016; SINGH et al., 2017). Um estudo realizado no México detectou a coinfecção de HCV e DENV (um flavivírus), no qual foi observado que, de 240 pacientes diagnosticados com dengue, 31 apresentaram a coinfecção. Além disso, a maior frequência de coinfecção foi observada em pacientes masculinos com quadro de dengue hemorrágica (19/31, ou 61,29%) (MACHAIN-WILLIAMS et al., 2014).

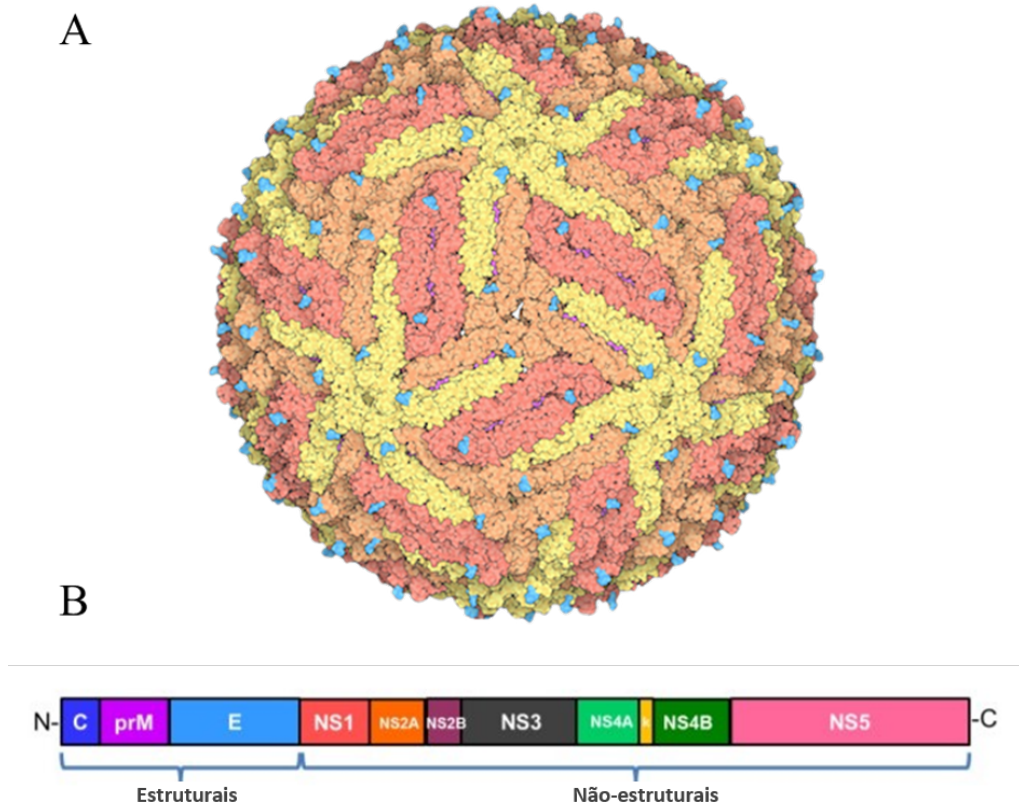
Por se tratar de morbidades com prevalência no mundo inteiro, as hepatopatias crônicas são doenças de base em pacientes acometidos pelos mais variados quadros clínicos. As recentes epidemias de arboviroses no continente americano levantam algumas questões sobre o possível efeito dessas viroses sobre patologias previamente estabelecidas e seus processos. Dessa forma, casos de coinfecção são situações muito prováveis, tendo em vista áreas de prevalência compartilhada entre as doenças e as rotas de transmissão em comum (assim como o HBV e o HCV, o ZIKV também é transmitido por via sexual e vertical) (MUSSO et al., 2015; BESNARD et al., 2014).

Durante as epidemias de arboviroses já foram descritos casos de infecção por flavivírus com acometimento hepático. Por exemplo, necrose multilobular e aumento das enzimas hepáticas decorrentes de infecção por febre amarela (CHEN, 2016). Assim como já

foi observado que o vírus da Dengue sorotipo 2 acomete o fígado de camundongos da linhagem BALB/C, com perda da integridade celular, necrose hepatocelular, infiltração mononuclear, edemas e esteatose (SAKINAH et al., 2017). Estudos *in vitro* com CEHs demonstraram que durante a infecção pelo HBV, elas apresentaram aumento na proliferação e aumento na expressão de colágeno I, PDGF, TGF- $\beta$ 1 e  $\alpha$ -SMA (GUO et al., 2009; BAI, et al., 2012). Isso também já foi visto com infecção pelo HCV, estudo no qual foi observado *upregulation* de MMP1, CCL2, IL-1 e IL-13 (AKIL et al., 2019), fatores envolvidos no processo fibrogênico.

### 2.3. VÍRUS ZIKA

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero flavivírus, assim como o vírus da Febre Amarela, Dengue e Febre do Oeste do Nilo. Este vírus possui RNA de fita simples e polaridade positiva, com 10,5 kb, envelopado e icosaédrico (HASAN, 2018) (Figura 5A). De acordo com análises filogenéticas, existem 3 cepas homólogas: linhagens africana, asiática e sul americana (PAWITWAR et al., 2017). O RNA viral possui apenas um quadro aberto de leitura, que codifica uma poliproteína precursora, a qual é clivada após a tradução em três proteínas estruturais (capsídeo, pré-membrana e envelope) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LEE & SHIN, 2019) (Figura 5B). Comparações entre a estrutura do ZIKV com os demais flavivírus demonstram um padrão de organização semelhante entre eles (SIHORI et al., 2017).

**Figura 5:** O Vírus Zika.

**Fonte:** (A) Disponível no PDB (<https://pdb101.rcsb.org/learn/paper-models/zika-virus-with-and-without-antibodies>, acesso em 02/02/2019)

(B) Adaptado de LEE & SHIN, 2019.

**Nota:** (A) Representação em 3D de uma partícula madura do vírus Zika, produzida por microscopia crioeletrônica. Os monômeros E estão em amarelo, laranja e vermelho; os sítios de glicosilação estão em azul. (B) Organização esquemática do genoma do vírus Zika. A única ORF codifica uma poliproteína com três componentes estruturais (capsídeo, pré membrana e envelope) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

No geral, a principal forma de transmissão de um arbovírus é a vetorial, cujo ciclo se inicia quando uma fêmea adulta de mosquitos vetores ingere sangue virêmico de um hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. São descritos dois ciclos de transmissão: o ciclo silvestre, responsável por manter a circulação do vírus em primatas e mosquitos nas florestas; e o ciclo urbano, no qual ocorre a transmissão entre mosquitos (principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) e seres humanos nas cidades (SONG et al., 2017; WEAVER et al., 2016).

O vírus é capaz de atravessar a barreira do intestino médio do mosquito e replicar nas células do epitélio do intestino e tecidos secundários, até atingir as glândulas salivares (FRANZ et al., 2015). Dessa forma, no próximo repasto sanguíneo, a saliva do mosquito contendo altos títulos virais atinge espaços extravasculares da pele do hospedeiro durante a

picada. Então, o vírus se replica nos queratinócitos e fibroblastos dermais e atinge a circulação (BRIANT et al., 2014). Várias populações celulares já tiveram sua permissividade à infecção pelo ZIKV descrita, como neurônios, astrócitos, células do nervo óptico, trofoblastos, células dendríticas e células endoteliais do pulmão, fígado, cérebro e cordão umbilical (SIROHI et al., 2017; PUERTA-GUARDO et al., 2019).

Inicialmente acreditava-se que a transmissão ocorria apenas através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, no entanto, após a epidemia no Brasil em 2015, foi descrito que o gênero *Culex* também é capaz de transmitir o vírus (GUEDES et al., 2017). Além disso, principalmente durante a epidemia na Polinésia Francesa, foram descritas as formas não vetoriais, como a transmissão sexual (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015), perinatal (BESNARD et al., 2014) e transfusional (MUSSO et al., 2014). Diferente de outros flavivírus, o ZIKV é capaz de ultrapassar a barreira placentária e infectar os tecidos do feto em desenvolvimento (MINER, 2017). Além disso, o RNA viral já foi detectado no líquido amniótico, urina e soro de mães cujos fetos apresentaram má formações; e no soro de recém-nascidos com microcefalia.

Estudos transversais avaliaram que o risco de transmissão sexual é mais comum de homem para mulher, devido à persistência viral no sêmen por um período mais prolongado (COUNOTTE et al., 2018; SANCHEZ-MONTALVA et al., 2018). Além do sêmen, o ZIKV foi detectado em fluido cervical, vaginal, saliva e urina. Para outros flavivírus, ainda não há evidências de transmissão sexual em humanos (MEAD et al., 2018a). Ademais, estudos *in vitro* observaram susceptibilidade de células humanas de Sertoli, prostáticas, testiculares e espermatozoides à infecção pelo ZIKV (KUMAR et al., 2018; CHAN et al., 2016; SPENCER et al., 2018; BAGASRA et al., 2017).

### **2.3.1. Epidemiologia do ZIKV**

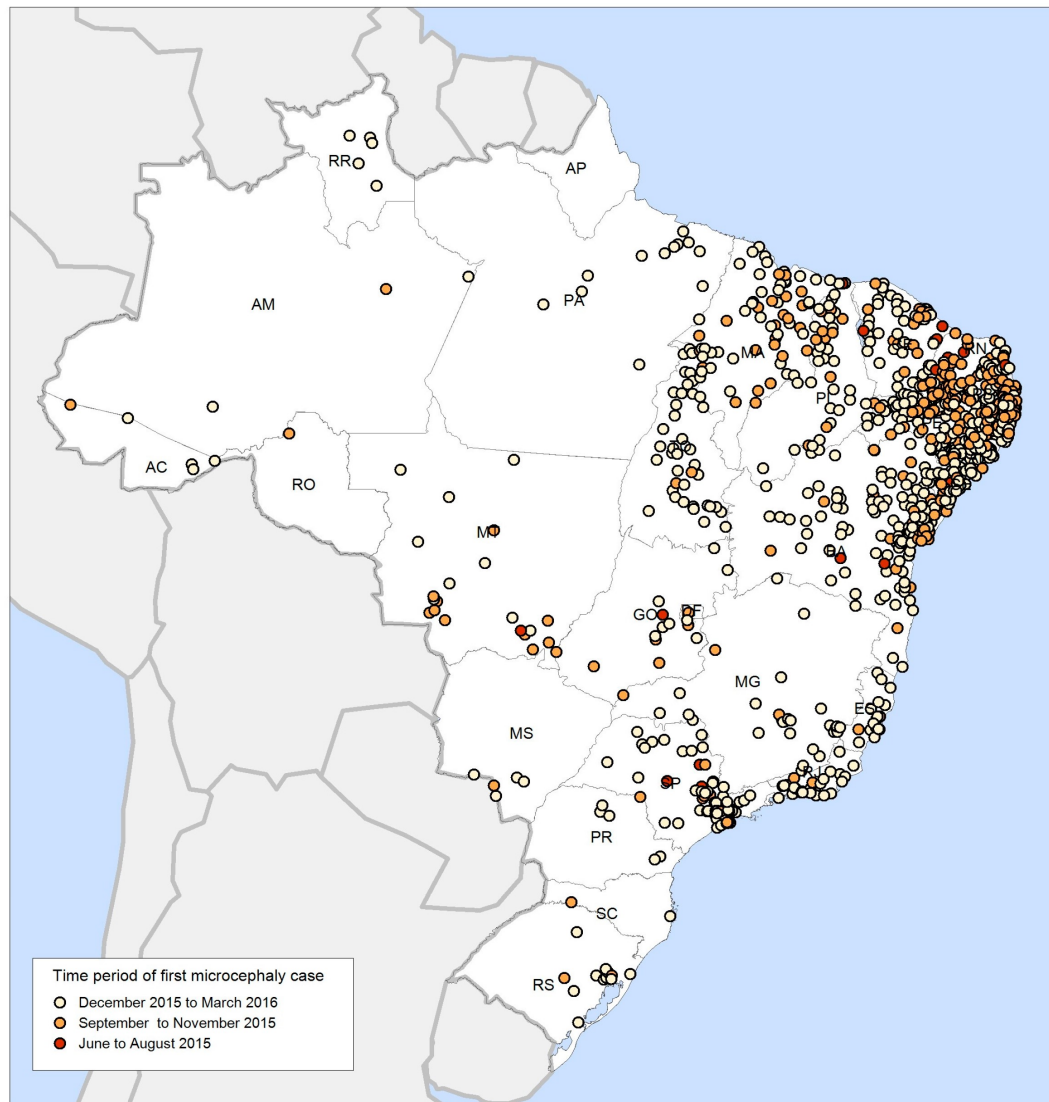
O ZIKV foi primeiramente isolado em 1947 na floresta Zika, em Uganda, do sangue de macacos-sentinela durante um estudo sobre febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). A detecção viral em mosquitos se restringia ao continente africano até que, em meados da década de 1980, houve uma expansão em sua distribuição geográfica para a Ásia equatorial, incluindo Índia, Paquistão, Malásia e Indonésia (DARWISH et al., 1983; MARCHETTE et al., 1969; OLSON et al., 1981).

A primeira epidemia de ZIKV foi descrita em 2007, na Ilha de Yap, dos Estados Federados da Micronésia. Como a ilha não é habitat de macacos, é considerado mais provável que a viagem de um humano ou mosquito infectado seja responsável por esse surto (GUILLAUMOT et al., 2009). Antes desta epidemia, não haviam sido relatados casos fora da África e Ásia. Também ocorreram surtos em outras ilhas do Pacífico, como na Polinésia Francesa em 2013. Durante essa epidemia, foi descrito aumento de casos com complicações neurológicas e autoimunes (como a SGB). Antes disso, não haviam sido descritos casos severos de infecção por ZIKV (IOOS et al., 2014). Esse surto foi seguido por casos na Ilha de Páscoa, Ilhas Cook e Nova Caledônia (CAO-LORMEAU et al., 2014; MUSSO & NILES, 2014; ROTH et al., 2014).

No ano de 2015, o ZIKV se espalhou rapidamente pelo continente americano e continuou a circular na área do Pacífico. Estima-se que até o fim do ano de 2015, houve cerca de 1.000.000 casos de ZIKV no Brasil, com relatos de casos autóctones a partir do mês de fevereiro de 2016 na maioria dos estados. Além disso, também foi observado aumento nos casos de síndrome neurológica e cerca de 400 casos suspeitos de microcefalia no Nordeste no mesmo ano (KINDHAUSER et al., 2016). Estudos sugeriram que esses casos seriam decorrentes da infecção pelo ZIKV durante a gestação e que pessoas de condição de vida precária apresentaram uma prevalência maior nos casos de microcefalia em relação à população de boa condição (DE ARAUJO et al., 2016; SOUZA et al., 2018), devido a fatores relacionados à proliferação do mosquito vetor, como falta de saneamento básico e reservatórios de água nas residências.

Após a epidemia na Polinésia Francesa, onde se verificou a associação com a síndrome neurológica em adultos, como a Síndrome de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU et al., 2016), mielite e meningoencefalite (DA CRUZ et al., 2018), o ZIKV mostrou-se um perigo para a saúde pública. Além disso, também se destacam a microcefalia e anormalidades oculares em neonatos decorrentes da transmissão perinatal (COSTA et al., 2016), muito observados durante a epidemia que aconteceu no Brasil, e que acometeu principalmente a região Nordeste, atingindo muitas famílias pobres (Figura 6).

**Figura 6:** Difusão espacial dos casos de microcefalia no Brasil, 2015-2016.



**Fonte:** LOWE et al., 2018.

**Nota:** Durante o período de junho de 2015 a março de 2016 ainda não havia evidências quanto a relação entre os casos de microcefalia e ZIKV. No entanto, a dispersão espacial dos casos de microcefalia seguiu a epidemia de ZIKV, tendo atingido principalmente a região Nordeste.

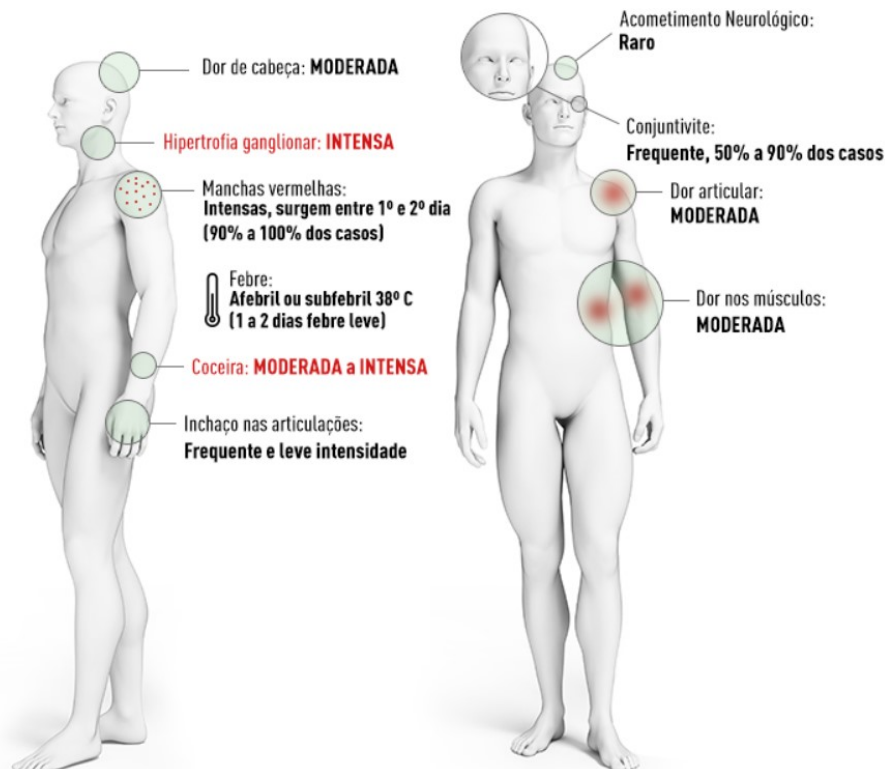
Devido ao grande número de casos de microcefalia associado à circulação de ZIKV, a Organização Mundial de Saúde e Organização Pan Americana de Saúde declararam o ZIKV como uma emergência de saúde pública no ano de 2015 (PAHO & OMS, 2015a). Após a epidemia de ZIKV no Brasil, foram descritos casos em Cabo Verde, Colômbia, Suriname, Panamá, El Salvador, México, Paraguai, Venezuela, Honduras e Guatemala (PAHO & OMS, 2015b). Atualmente, a infecção por ZIKV possui baixa incidência mundial, sendo responsável por alguns surtos sazonais, coincidindo com o período de reprodução dos mosquitos vetores (CHEN et al., 2019). A SCZ (síndrome congênita relacionada à infecção pelo ZIKV) tornou-

se um agravo de notificação compulsória, com os casos suspeitos de gestantes ou recém-nascidos notificados no SINAN (Sistema de informação de notificação de agravos de notificação) e confirmados, no RESP (Registro de eventos de saúde pública) (BRASIL, 2017).

### 2.3.2. Fisiopatologia do ZIKV

O ZIKV, em geral, é responsável por uma doença autolimitada de sintomas moderados, com 4 a 10 dias de incubação. Seus principais sintomas são bastante similares às demais arboviroses. As manifestações clínicas consistem em cefaleia, conjuntivite, hipertrofia ganglionar, febre, artralgia, mialgia, *rash* cutânea e coceira (PLOURDE & BLOCH, 2016) (Figura 7). Apesar de estar descrita desde 1952 na literatura, a infecção por ZIKV não recebia a devida atenção, devido aos casos esporádicos nos continentes africano e asiático.

**Figura 7:** Sintomas da infecção causada pelo vírus Zika.



**Fonte:** Ministério da Saúde, disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>, acesso em 01/03/2019.

**Nota:** O vírus Zika geralmente causa uma doença de acometimento moderado, de sintomas semelhantes às demais arboviroses, como dor de cabeça, *rash* cutânea, febre, hipertrofia ganglionar, coceira, inchaço nas articulações, conjuntivite e dor nas articulações e músculos. No entanto, em alguns casos há o acometimento neurológico, podendo acarretar em síndrome neurológica.



Pesquisas acerca da patogênese do ZIKV demonstraram que além do cérebro, o RNA viral pode ser detectado no fígado e rim de camundongos (YADAV et al., 2017) e macacos Rhesus (DUDLEY et al., 2017) após infecção por picada de mosquitos infectados. Também foi descrito que um dos efeitos da infecção por ZIKV é a indução de resposta inflamatória através da secreção de IL-1 $\beta$ , observada no cérebro, baço, fígado e rim de camundongos A129 infectados (WANG et al., 2018).

Análises *post mortem* observaram que pacientes infectados por ZIKV apresentaram necrose hepatocelular, edema, esteatose multifocal e infiltrado inflamatório em análises histopatológicas do fígado (AZEVEDO et al., 2016). Além disso, foi descrito na China um caso fatal, no qual o paciente desenvolveu disfunção hepática severa e alterações na coagulação após acometimento por ZIKV (WU et al., 2017). Além disso, estudos sugerem que o ZIKV pode se replicar de forma constante em alguns tipos celulares, como foi observado em células progenitoras neurais humanas da linhagem hNP e células epiteliais do túbulo proximal da linhagem HK2, sugerindo potenciais reservatórios do vírus no corpo humano (HANNERS et al., 2016; CHEN et al., 2017). Além disso, já foi descrita a persistência do ZIKV em amostras de sêmen por cerca de 3 meses em pacientes sintomáticos (MEAD et al., 2018b; MANSUY et al., 2016).

Estudos *in vitro* realizados com infecção pelo ZIKV em hepatócitos imortalizados (células imortalizadas derivadas de tumor hepático das linhagens Huh7 e HepG2) e células hepatócito-*like* derivadas de células-tronco humanas pluripotentes demonstraram que essas linhagens são capazes de suportar o ciclo de replicação viral e apresentaram efeito citopático (CPE) (SHERMAN et al., 2019; TRICOT et al., 2018). No entanto, aspectos relacionados ao processo de reparo hepático ainda não foram avaliados. Foram realizados trabalhos relacionando CEHs e infecção viral, nos quais foi observada superexpressão de alguns fatores fibrogênicos, no entanto apenas com HCV e HIV (AKIL et al., 2019; GANESAN et al., 2018; DEVHARE et al., 2017).

Durante a execução desse estudo, pretendeu-se avaliar a permissividade dos hepatócitos e CEHs de linhagem quanto à infecção pelo ZIKV, a taxa de replicação do vírus nessas células e as possíveis implicações na viabilidade celular e na expressão de fatores envolvidos no processo de fibrogênese hepática.

### 3. JUSTIFICATIVA

Apesar de encontrarmos na literatura descrição do vírus Zika desde 1952, o conhecimento adquirido sobre coinfeções ainda é bastante restrito. Tendo em vista sua rápida expansão na distribuição geográfica, além de rotas de transmissão em comum com as hepatites B e C, é muito provável que tenham ocorrido casos de coinfeção entre o vírus e doenças hepáticas previamente estabelecidas. Ainda não existem dados epidemiológicos concretos acerca dessa infecção concomitante, porém alguns relatos de caso pontuais descrevem o acometimento hepático decorrente da infecção por ZIKV, além de estudos *post-mortem*, nos quais foi possível observar a presença do RNA viral no fígado, rim e cérebro.

No fígado ocorrem inúmeros processos complexos, fisiológicos e patológicos, que envolvem diferentes populações celulares. Possivelmente o decorrer e o resultado desses processos podem ser influenciados pela infecção viral, devido à resposta inflamatória em resposta ao vírus ou à própria toxicidade viral. Dessa forma, esse estudo se propôs a verificar a capacidade infectiva do vírus Zika sobre os hepatócitos e células estreladas hepáticas, tendo como foco avaliar o processo de lesão das células hepáticas associado à infecção pelo ZIKV, analisando as possíveis alterações em fatores envolvidos no processo de cicatrização e reparo do fígado decorrentes da infecção. Com os dados obtidos neste trabalho, espera-se contribuir com a literatura, acrescentando novas informações sobre a infecção pelo ZIKV e sua fisiopatologia.

#### **4. HIPÓTESE**

O vírus Zika infecta hepatócitos e células estreladas hepáticas e inibe o processo de reparo hepático.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo geral**

Verificar se hepatócitos e células estreladas hepáticas são permissivos à infecção pelo ZIKV e suas implicações no reparo hepático.

### **5.2. Objetivos específicos**

Verificar a capacidade de infecção pelo ZIKV nas linhagens celulares HepG2, LX-2 e GRX;

Caracterizar e comparar aspectos ultraestruturais das linhagens celulares HepG2, LX-2 e GRX após infecção pelo ZIKV.

Determinar a viabilidade das linhagens celulares HepG2, LX-2 e GRX após infecção pelo ZIKV;

Avaliar a produção de citocinas pró-fibrogênicas e pró-inflamatórias nas linhagens celulares HepG2, LX-2 e GRX após infecção pelo ZIKV;

## 6. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Nessa seção serão descritos os procedimentos e materiais que foram utilizados durante a execução deste trabalho.

### 6.1. CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES

Todas as linhagens cultivadas apresentam capacidade de aderência ao plástico e foram cultivadas em DMEM (Gibco, South America) suplementado com diferentes concentrações de soro fetal bovino - SFB (Gibco, USA) e solução de penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco, USA) e mantidas em estufa à 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem 70%-90% de confluência, as células eram lavadas com PBS e tratadas com solução de tripsina 0,2% + EDTA 0,02% e repassadas numa proporção de 1:4. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3-4 dias após a passagem. As células foram visualizadas através de microscopia óptica.

#### 6.1.1. HepG2

Linhagem de célula imortalizada com morfologia semelhante a células epiteliais, isolada de hepatoblastoma primário humano e caracterizada como hepatócito imortalizado. Foi fornecida pela Dra. Valéria Pereira Hernandez do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ PE). Foi mantida em cultivo com DMEM *low glucose* suplementado com 10% de SFB.

#### 6.1.2. LX-2

Linhagem de CEH estabelecida em 2005, obtida espontaneamente de tecido hepático humano, imortalizadas através de transfecção do antígeno T SV40 e selecionada em condições de baixa disponibilidade de SFB. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Scott L. Friedman (Division of Liver Diseases, na Icahn School of Medicine do Hospital Mount Sinai). Foi mantida em cultivo com DMEM *high glucose* suplementado com 10% de SFB.

### 6.1.3. GRX

Linhagem imortalizada de CEH estabelecida em 1985, isolada de granulomas hepáticos do fígado de camundongos C3H/HeN infectados por penetração transcutânea de cercárias de *Schistosoma mansoni* Cepa BH. Essas células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro). Foi mantida em cultivo com DMEM low glucose suplementado com 10% de SFB.

### 6.1.4. Vero

Linhagem celular imortalizada de morfologia epitelial, isolada em 1962 a partir do rim de macaco-verde africano (YASUMURA; KAWAKITA, 1963). Essa linhagem é bastante utilizada em procedimentos de virologia, pois possui susceptibilidade comprovada para vários tipos de vírus. Foi mantida em cultivo com DMEM low glucose suplementado com 10% de SFB.

## 6.2. ESTOQUE VIRAL

O estoque de ZIKV utilizado nesse estudo foi a cepa ZIKV/H. Sapiens/Brazil/PE243/2015, cedida pelo grupo de pesquisa Dr. Lindomar Pena do Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTe) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ PE). Essa cepa foi isolada em 2015, de paciente exantemático no estado de Pernambuco (GenBank sequence: KX197192.1). O estoque foi amplificado pelo crescimento em cultura de células Vero e armazenado a -80°C em DMEM suplementado com 2% SFB para posterior uso. A titulação das alíquotas foi feita utilizando o ensaio de TCID<sub>50</sub> em células Vero.

## 6.3. ENSAIO DE PLACA TCID<sub>50</sub>

Para analisar a capacidade de replicação viral nas linhagens celulares em estudo, foi realizada a curva de crescimento viral *one-step*, na qual foram avaliadas as variáveis ‘tempo’ e ‘tipo celular’. Para isso, as linhagens celulares foram cultivadas na densidade de  $1 \times 10^6$  células em placas de cultura de 6 poços e, após 24h, foram infectadas com 300µL de DMEM contendo ZIKV na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. Para realizar essa curva de crescimento viral *one-step* também foi cultivada a linhagem de células Vero, que foi utilizada

como comparativo, por ter efeitos citopáticos bem descritos durante a infecção pelo ZIKV (COELHO et al., 2017; NIKOLAY et al., 2018).

Após o intervalo de 1h, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e cultivados em 3mL de DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram fotografadas nos intervalos de 1, 3 e 5 dias após a infecção, assim como foram coletados 300µL de sobrenadante nos intervalos 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h após infecção.

Os sobrenadantes coletados foram titulados em células Vero pelo método de TCID<sub>50</sub>, onde é calculada a quantidade de vírus necessária para produzir efeito citopático em 50% das células inoculadas. Células Vero foram plaqueadas na densidade de 10<sup>4</sup> células/poço em placas de 96 poços, e após 24h, foram condicionadas com 50uL de diferentes diluições do sobrenadante, em 7 diluições seriadas feitas em quadruplicata. Após 1h, os poços receberam 150µL de meio DMEM 2% SFB, para completar o volume final de 200µL. As placas foram avaliadas em microscópio invertido para observação de possíveis efeitos citopáticos depois de 4 dias de incubação na estufa. O TCID<sub>50</sub> foi calculado através de planilha no Microsoft Office Excel versão 2013, pelo método de Reed-Muench, tendo como base quantos poços apresentaram efeito citopático em cada uma das diluições.

## 6.4. ULTRAESTRUTURA

Para avaliar e comparar os efeitos da infecção pelo ZIKV nas linhagens estudadas foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

### 6.4.1. Microscopia eletrônica de transmissão

A caracterização do efeito citopático no nível ultraestrutural, além da localização do vírus nas células infectadas foi realizada através da microscopia eletrônica de transmissão. As linhagens celulares foram cultivadas na densidade de 10<sup>5</sup> células/mL em garrafas T25cm<sup>2</sup> de cultura. As células do grupo infectado foram infectadas após 24h, como descrito anteriormente, enquanto que nas garrafas do grupo controle foi realizada a troca de meio. Após o intervalo de 3 dias depois da infecção, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e as células foram lavadas em meio livre de soro e antibiótico, seguido de lavagens com PBS estéril. A fixação foi feita com solução de glutaraldeído (2,5%) em cacodilato de sódio 0.1M (pH 7,2) por 1h e após isso, a pós-fixação, com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,6%, por 1h. Então, as células foram lavadas com PBS e desidratadas em séries

crencentes de acetona (70% - 90% - 100%). As células foram infiltradas em resina EPON 812 e emblocadas em estufa a 60°C. Os cortes (espessura entre 60nm – 70nm) foram feitos em ultramicrotomo e contrastados com acetato de uranila. A análise das grades contendo o material foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CXII (JEOL, Massachusets, USA).

## 6.5. ENSAIO DE VIABILIDADE

A viabilidade das linhagens celulares após infecção pelo ZIKV foi determinada por ensaio de XTT. Cada linhagem foi cultivada na densidade de  $5 \times 10^3$  em placas de cultura de 96 poços, em triplicata. Após 24h, o ZIKV foi adicionado nos poços no MOI de 0,1. Após os intervalos de 24h, 72h e 120h de infecção, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS. As células foram incubadas com 50µl de XTT diluído em meio livre de fenol (concentração final de 0,25 mg/ml) por 4h. A reação se baseia no princípio de que as células viáveis reduzem o composto 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida em cristais de formazan, que dão a coloração laranja à reação. Após o período de incubação, as placas foram agitadas gentilmente para solubilização dos cristais. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro leitor de microplacas (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 455nm, com correção de 570nm. A porcentagem de sobrevivência foi calculada com a fórmula  $(ABS_{\text{infectadas}}/ABS_{\text{não-infectadas}}) \times 100$ .

## 6.6. ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

Para quantificar a produção de citocinas envolvidas no processo de reparo e cicatrização hepática pelas linhagens celulares avaliadas, foram realizados os ensaios imunológicos descritos nessa seção.

### 6.6.1. CBA

A dosagem das citocinas IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 humanas presentes em amostras de sobrenadante coletadas nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h após infecção pelo ZIKV no MOI de 0.1 foi feita utilizando o Kit CBA Inflamatório (BD Biosciences), segundo as recomendações do fabricante. Foi adicionado 50µl de beads conjugadas a anticorpos de captura, seguidos de 50µl de cada amostra (em triplicata) ou diluição do padrão e 50µl de anticorpos de detecção conjugados ao fluorocromo PE. Após o intervalo de incubação de 3h em local protegido da luz, foi adicionado 1 ml da solução de lavagem em



cada tubo, para que fossem centrifugados a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e 300µl de solução de lavagem foram adicionados aos tubos para ressuspender os *pellets*. As reações foram lidas no citômetro de fluxo (FACSCalibur) e os dados foram avaliados de acordo com o padrão de migração de cada analito no histograma durante a aquisição.

### 6.6.2. ELISA

Para a dosagem da citocina TGF-β1 presente em amostras de sobrenadante coletadas nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h após infecção pelo ZIKV no MOI de 0.1, foi utilizada a técnica de ELISA Sanduíche com os kits Human/Mouse TGF-β1 (eBioscience, San Diego, CA, USA) e Mouse IL-6 Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Foram adicionados 100µl dos anticorpos de captura por poço em placas de 96 poços. As placas foram incubadas *overnight* em câmara úmida e refrigerada. Então, após uma série de lavagens, a curva-padrão foi feita através de diluição seriada e 100µl das amostras foi adicionado aos seus respectivos poços, em duplicata. Após incubação *overnight* (para otimizar a sensibilidade), as placas foram lavadas e foram adicionados os anticorpos de detecção conjugados à biotina (100µl/poço). Após incubadas por 2h e lavadas, as placas foram incubadas com 100µl da enzima peroxidase e, então, novamente lavadas para posterior adição de 100µl do substrato TMB. A reação do substrato com a enzima conjugada aos anticorpos aderidos à placa confere a coloração azul aos poços. Para interromper a reação, foi adicionado 100µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura da densidade óptica foi determinada por leitor de microplacas (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 570nm. A concentração das citocinas foi calculada em pg/mL.

## 6.7. ENSAIOS MOLECULARES

Para realizar a quantificação da carga viral relativa do ZIKV nas amostras foram realizados os processos descritos nessa seção.

### 6.7.1. Extração de RNA total

As linhagens celulares foram cultivadas na densidade de 1x10<sup>6</sup> células/poço em placas de cultura de 6 poços e, após 24h, foram infectadas com ZIKV como descrito anteriormente. Após o intervalo de 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h dpi, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Os *pellets* celulares foram ressuspensos utilizando 1ml de Trizol (Invitrogen).

Para isolamento do RNA dos demais componentes, foi adicionado 200µl de clorofórmio, seguido de homogeneização por 15 segundos e centrifugação a 12000 x g por 15 minutos, para separação. A fase superficial e translúcida (RNA) foi cuidadosamente removida para um novo tubo. O RNA foi precipitado em 500µl de isopropanol absoluto *overnight* a -20°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos e os pellets, lavados com 500µL de etanol 70% e centrifugados por mais 15 minutos. O material foi ressuspenso em 22µL de água ultra-pura. O RNA total foi então submetido a uma corrida em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Applied Biosystems) para verificação de sua integridade e sua concentração foi quantificada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop D-1000. O RNA total foi tratado com a enzima DNase I.

### 6.7.2. RTPCR

Para confirmação da infecção e quantificação da carga viral total de ZIKV presente nas amostras isoladas nos intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h dpi, também foi realizada a técnica de RT-PCR, utilizando o kit molecular ZDC (Biomanguinhos). Para isso, a placa com o mix contendo 1,0 µg de RNA total, enzima RT, *primers* ZC e sondas ZC foi incubada no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). O procedimento foi realizado nas condições de 45 ciclos de 95°C por 15 minutos, 50°C por 2 minutos, 95°C por 15 segundos e 60° por 1 minuto. Assim como indicado pelo fabricante, foram consideradas negativas amostras que apresentaram valores de Ct maiores que 38 ciclos.

## 6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em valores médios (média ± DP). Inicialmente, os dados quantitativos foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e baseados no valor de P, os dados foram submetidos a um teste paramétrico (*one way* ANOVA), ou não-paramétrico (Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn). Os dados da curva de crescimento viral foram inicialmente submetidos ao teste *two way* ANOVA, para avaliar a interação entre as variáveis ‘tempo’ e ‘linhagem celular’. A partir disso, os valores de título viral nas diferentes linhagens foram comparados entre si dentro de cada período avaliado, utilizando *two way* ANOVA com pos-hoc de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, USA). O valor de P < 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Para este estudo foram utilizadas três linhagens celulares estabelecidas (GRX, LX-2 e HepG2) que não necessitaram de aprovação pela Comissão de Ética.

## 8. RESULTADOS

Nessa seção serão descritos os resultados obtidos nos experimentos e suas respectivas análises.

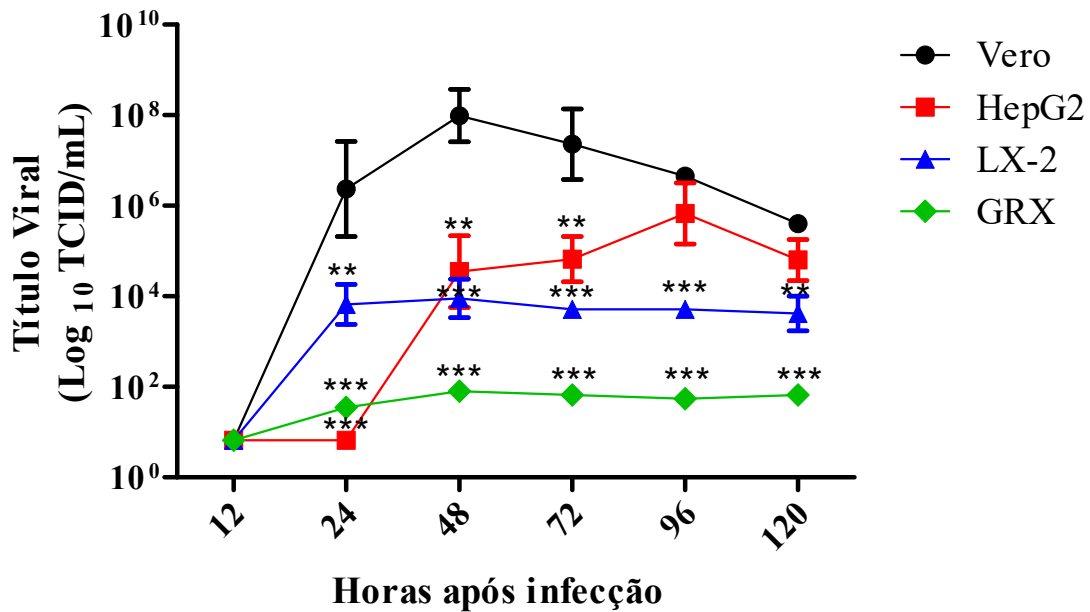
### 8.1. AS LINHAGENS CELULARES HEPG2, GRX E LX-2 SÃO PERMISSIVAS À INFECÇÃO PELO ZIKV

Foi observado que as linhagens celulares avaliadas nesse trabalho se apresentaram permissivas à infecção pelo ZIKV.

#### 8.1.1. Replicação viral nas linhagens celulares

A curva de crescimento viral foi executada para avaliar a infectividade e replicação do ZIKV nas células hepáticas *in vitro*. Todas as linhagens celulares avaliadas se mostraram permissivas à infecção. Após titulação e cálculo do TCID<sub>50</sub>, foi observado que as quatro curvas de crescimento viral se mostraram distintas (Figura 8). No primeiro intervalo observado, de 12 horas, não foi observado título viral detectável em nenhuma das linhagens celulares. Tal fato pode ser explicado pela fase de eclipse viral, que se refere ao período no qual o vírus em questão leva para penetrar na membrana celular e iniciar a síntese das partículas virais.

**Figura 8:** Curva de crescimento *one-step* do ZIKV nas linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Dados referentes à produção de partículas virais infecciosas nas linhagens celulares estudadas. Os resultados foram denotados em cores distintas para fácil visualização. Em preto: Linhagem Vero; Em vermelho: Linhagem HepG2 (hepatócito); Em azul: Linhagem LX-2 (CEH humana); Em verde: Linhagem GRX (CEH murina). TCID<sub>50</sub>/mL: Dose Infectiva em 50% da cultura de tecidos/mililitro. Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes em relação à linhagem controle de células VERO em cada intervalo específico (\*\*\* = p<0.001; \*\* = p<0.01; \* = p<0.05).

A partir das primeiras 24 horas após infecção, apenas as linhagens Vero e LX-2 apresentaram replicação viral detectável. As células Vero atingiram pico de replicação no intervalo de 48 horas (com  $7,99 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL) e a partir desse momento, os valores de título decaem, porém, mantém o título viral acima das outras linhagens em todos os intervalos avaliados. Já a linhagem de hepatócitos HepG2 apresentou replicação viral detectável a partir das 48 horas, com pico replicativo nas 96 horas após infecção (com  $5,874 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL). A partir desse intervalo, os valores de título de Vero e HepG2 apresentam diferenças estatísticas quando comparados com a linhagem LX-2 e GRX, mas não entre si. A partir das 96 horas após infecção, a linhagem HepG2 se mostrou tão eficaz na produção de partículas virais quanto à linhagem Vero.

As linhagens de CEHs LX-2 e GRX não apresentaram picos nos valores de título viral em nenhum dos intervalos, mantendo valores aproximados do começo ao fim. No entanto, tais valores apresentaram diferenças estatísticas mutuamente a partir do primeiro intervalo, com LX-2 produzindo cerca de  $3,491 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL e GRX,  $1,2 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL, em média, durante o experimento. O tempo é responsável por 43,63% da variância total, enquanto que a

linhagem celular é responsável por 34,31%. Se não houvesse interação, existiria menos de 0,01% de probabilidade deste evento ser observado aleatoriamente. Ambas são interações significantes ( $p < 0,0001$ ).

### **8.1.2. Efeito citopático**

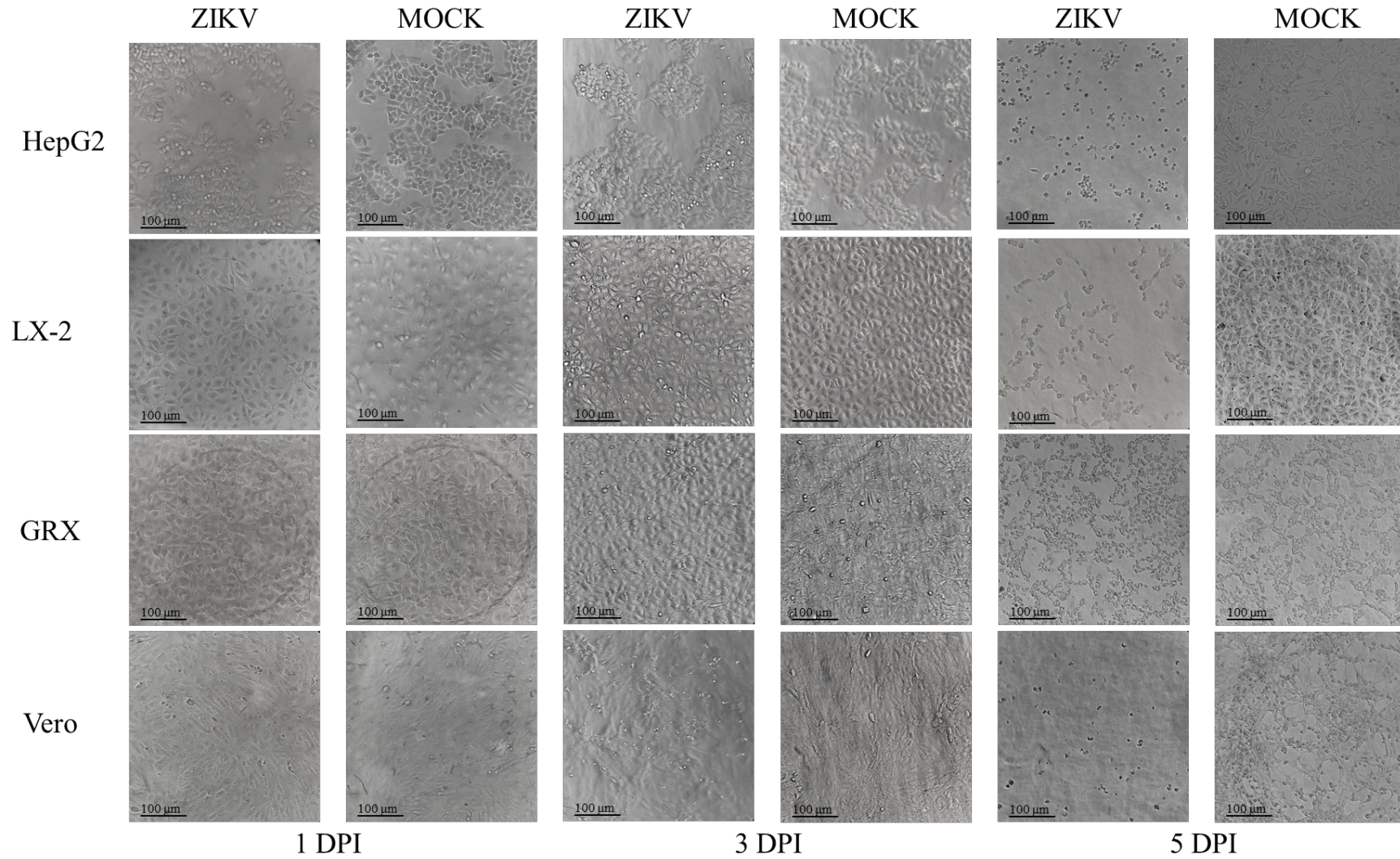
Os ensaios de cultura celular realizados com células imortalizadas de hepatócitos (HepG2) e células estreladas hepáticas (GRX e LX-2) demonstraram morfologias características das linhagens utilizadas, apresentando aspecto epitelioide e fibroblastoide, respectivamente. Tendo em vista a proporção de 1:4 por repique, as linhagens HepG2 e GRX apresentaram capacidade proliferativa aumentada quando comparadas à linhagem LX-2. Enquanto que as primeiras atingem confluência de 80% com um intervalo curto (entre 3 a 4 dias), as células LX-2 levaram cerca de 10 a 15 dias para atingir a confluência desejada e requeriam um meio com maior concentração de glicose para se proliferar (DMEM *high glucose*).

A linhagem GRX é capaz de crescer além da monocamada quando atingem confluência acima de 80%, proliferam-se uma sobre as outras, formando estruturas de *hills and valleys*, como descrito durante seu isolamento (BOROJEVIC et al., 1985). Enquanto que as células LX-2 apresentaram o crescimento moderado e aparência achatada durante visualização em microscópio invertido.

Durante os ensaios de infecção viral, foi observado que nenhuma das linhagens celulares avaliadas apresentou efeito citopático aparente no intervalo de 24 horas após infecção. Isso se deve ao curto período de tempo, no qual o vírus ainda não atingiu um título capaz de causar algum dano visível à célula hospedeira.

Assim como é esperado para esta linhagem, as células Vero apresentaram efeito citopático característico decorrente da infecção viral após 72 horas de infecção. Foi possível observar que o vírus acarretou em alterações na permeabilidade celular, levando à turgidez (“*rounding*”), vacuolização e individualização das células (Figura 9). O pico na replicação viral de ZIKV na linhagem de célula Vero coincide com os efeitos citopáticos observados durante o experimento. Em comparação, as demais linhagens celulares não apresentaram nenhum efeito citopático nesse período.

**Figura 9:** Linhagens celulares infectadas por ZIKV e controles (MOCK) nos intervalos de 1, 3 e 5 dias após a infecção.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** As células foram fotografadas com câmera fotográfica acoplada ao microscópio invertido.

Por fim, durante a observação do último intervalo avaliado, de 5 dias após infecção, foi possível observar efeito citopático mais agressivo na linhagem Vero, que apresentou destacamento da superfície da placa e acúmulo de debris no sobrenadante. Isso indica que grande parte das células havia morrido, além do inchaço celular inicial que podia ser observado nas células aderidas que restaram.

Nas linhagens HepG2 e LX-2, as células controles apresentam-se confluentes, enquanto que nos poços infectados foi observado destacamento da superfície e poucas células aderidas, indicando efeito citopático decorrente da infecção viral. Além disso, em uma pequena parte das células LX-2 aderidas pode ser observada vacuolização. Enquanto que na linhagem GRX, não foi observada diferença entre as células controles e infectadas, demonstrando que essas células não apresentam efeito citopático para infecção do ZIKV.

Tendo em vista os resultados da curva viral, dentre as linhagens de interesse deste trabalho, a HepG2 é a que produz as maiores titulações virais e o intervalo em que o efeito citopático pôde ser observado condiz com o pico de replicação viral: a partir de 96 horas. Quanto às células estreladas, a LX-2 não produz grandes valores de título e, no entanto, apresentou efeito citopático no último intervalo avaliado, o que sugere susceptibilidade celular pronunciada. Por fim, a linhagem GRX manteve-se viável durante todo os períodos avaliados, o que pode ser explicado pelos baixos títulos virais que produz.

### **8.1.3. Quantificação da carga viral**

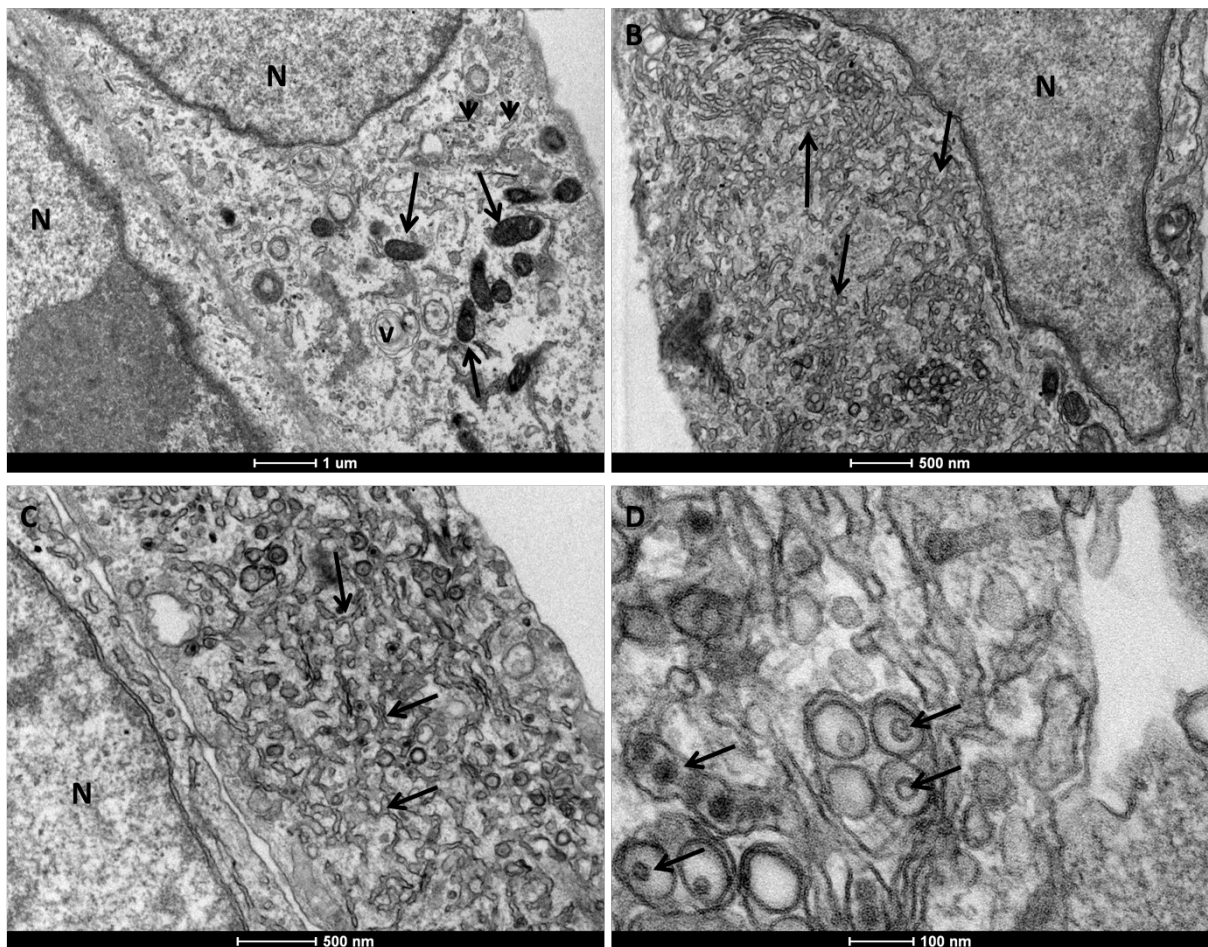
A confirmação da infecção nas amostras de cultura celular foi realizada utilizando amostras de 120 horas após infecção, para executar a técnica de RT-PCR. Do ponto de vista qualitativo, a infecção viral foi confirmada, tendo em vista que houve amplificação nas amostras provenientes de todas as linhagens. Do ponto de vista quantitativo, a amplificação precoce observada na linhagem Vero, após 14,5 ciclos, indica que o vírus estava presente em maior quantidade. A linhagem HepG2 amplificou após 17 ciclos, enquanto que a LX-2, após 21,7 ciclos, indicando menores títulos virais.



### 8.1.4. Análise ultraestrutural

O ZIKV foi visualizado em células representativas utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A linhagem foram avaliadas 72 horas após infecção, em busca de alterações morfológicas. A linhagem Vero apresentou hipertrofia do retículo endoplasmático associado a compartimentos vesiculares contendo partículas virais e interconexões nas redes de microtúbulos (Figura 10 B-D) em comparação ao controle (Figura 10 A).

**Figura 10:** Ultraestrutura das células Vero.

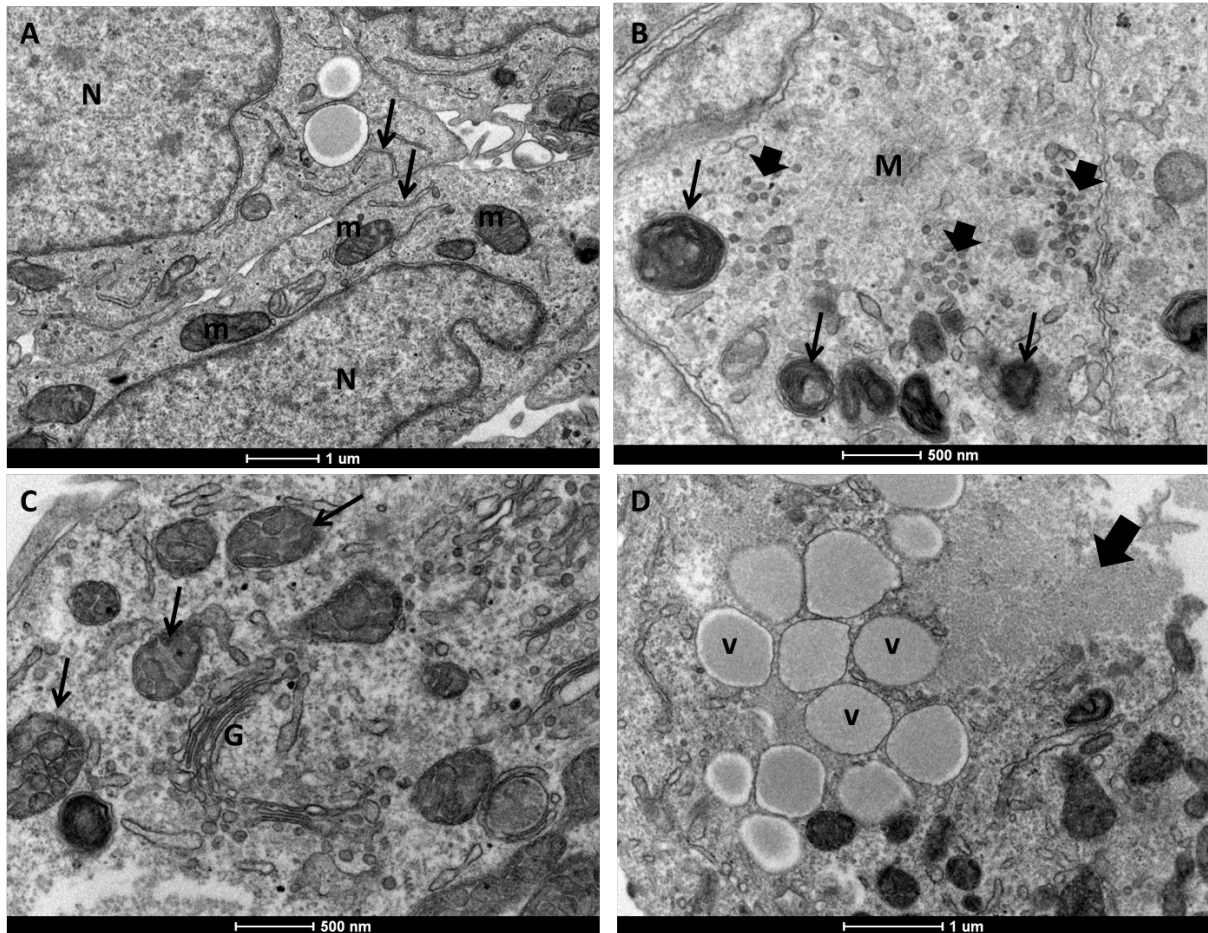


**Fonte:** A autora.

**Nota:** Imagens referentes à análise ultraestrutural da linhagem Vero. (A) Vero não infectada (MOCK), apresentando o núcleo (N) de duas células adjacentes, mitocôndrias eletrodensas (setas), retículo endoplasmático (ponta de setas) e vacúolos (v). (B) Vero infectada pelo ZIKV, apresentando retículo endoplasmático hipertrofiado (setas). (C) Vero infectada em maior detalhe, com retículo endoplasmático hipertrofiado composto por rede de inúmeros túbulos interconectados (setas). (D) Vero infectada em maior detalhe com a presença de vírus dentro dos túbulos do RE (setas).

A linhagem de hepatócitos HepG2 infectada pelo ZIKV apresentou autofagossomos partículas virais periféricas próximas à rede de microtúbulos (Figura 11 B) em comparação ao controle (Figura 11 A). Além disso, também se observa mitocôndrias contendo vesículas internas e acúmulo de material amorfo no citoplasma e vacúolos (Figura 11 C-D).

**Figura 11:** Ultraestrutura das células HepG2.

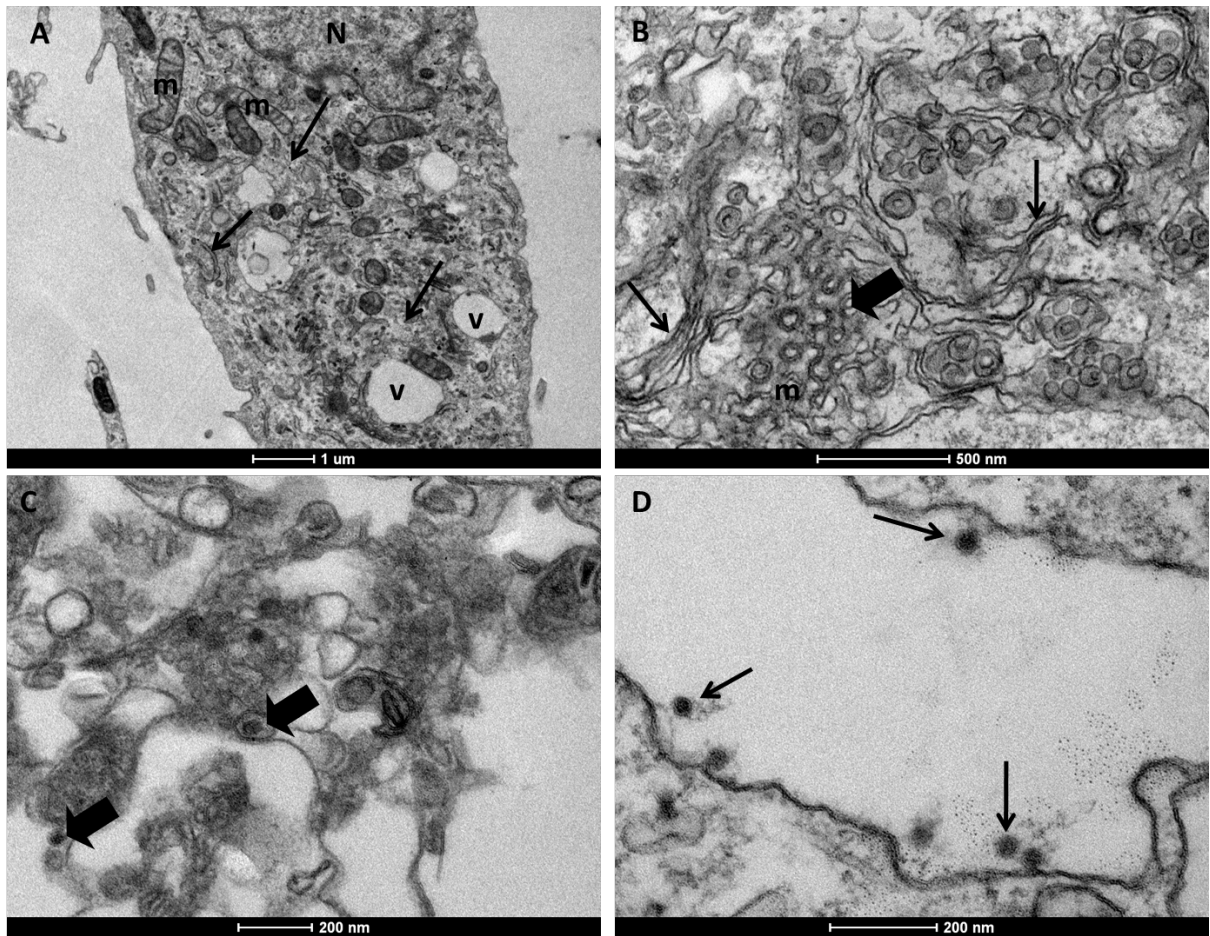


**Fonte:** A autora.

**Nota:** Imagens referentes à análise ultraestrutural da linhagem HepG2. (A) HepG2 não infectada (MOCK), apresentando núcleo ovalado (N), numerosas mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (setas). (B) HepG2 infectada pelo ZIKV, apresentando autofagossomos (setas) e partículas virais (setas çargas) próximo a uma matriz tubular (M). (C) HepG2 infectada apresentando complexo de Golgi (G) e mitocôndrias eletrondensas, contendo estruturas vesiculares (setas). (D) HepG2 infectada apresentando inúmeros vacúolos contendo possivelmente glicogênio (v) e o citoplasma apresenta grande acúmulo deste material amorfo (seta larga).

A linhagem de CEHs humanas LX-2 infectada pelo ZIKV apresentou hipertrofia no retículo endoplasmático com formação de vesículas contendo partículas virais e formação de matriz tubular (Figura 12 B-D) em comparação às células não infectadas (Figura 12 A).

**Figura 12:** Ultraestrutura das células LX-2.

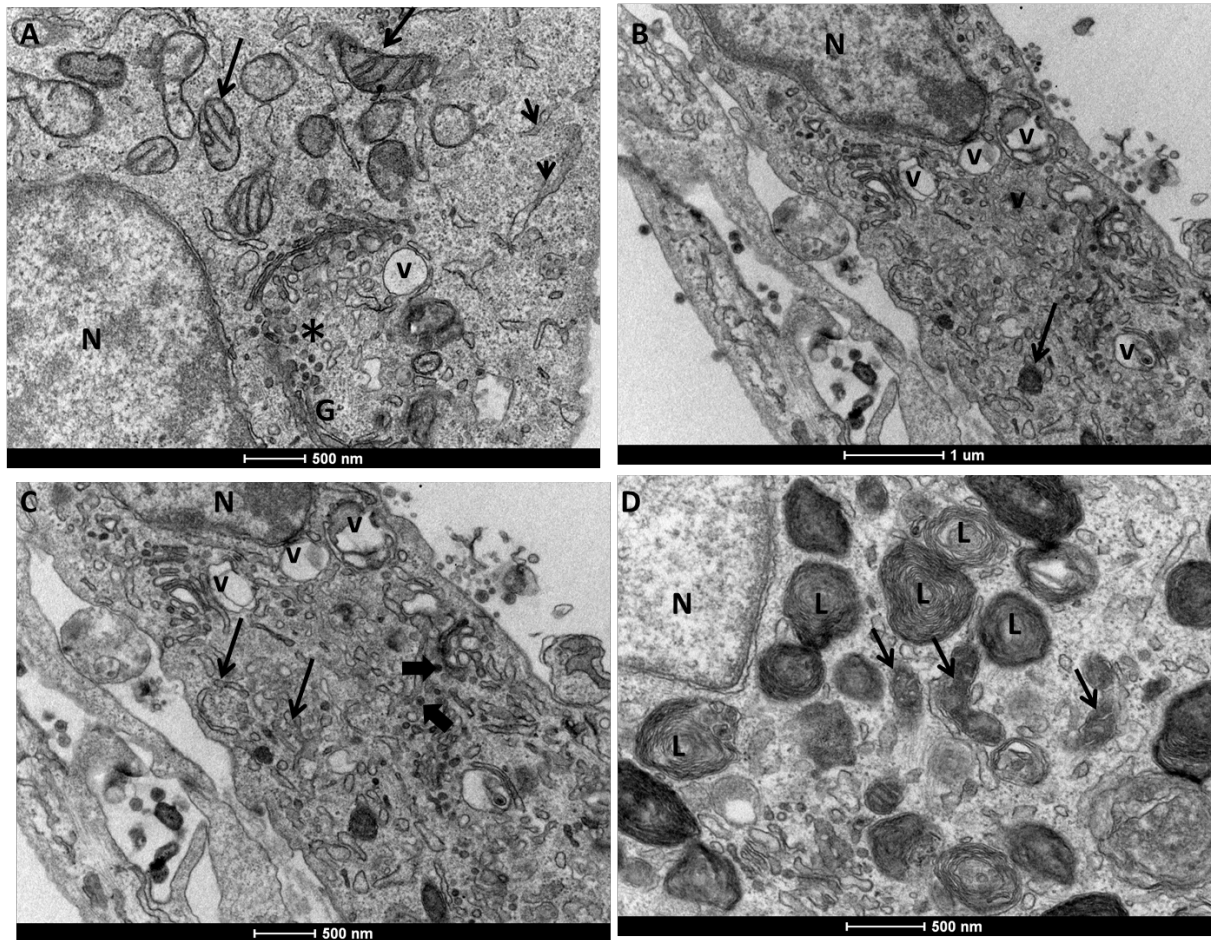


**Fonte:** A autora.

**Nota:** Imagens referentes à análise ultraestrutural da linhagem LX-2. (A) LX-2 não infectada (MOCK), demonstrando presença de núcleo (N), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (setas), vacúolos (v) e retículo endoplasmático (seta). (B) LX-2 infectada pelo ZIKV, apresentando retículo endoplasmático hipertrofiado (setas) e formação de uma matriz tubular e produção de vesículas (seta larga). (C) LX-2 infectada com maior detalhe da formação de partículas virais no interior de vesículas da matriz tubular do retículo endoplasmático (setas largas). (D) LX-2 infectada apresentando inúmeras partículas virais associados à membranas do retículo endoplasmático.

A linhagem de CEHs murinas GRX infectadas pelo ZIKV apresentou maior número de vacúolos e hipertrofia do retículo endoplasmático (Figura B-C) quando comparadas às células controle (Figura 13 A). Além disso, também é possível observar algumas mitocôndrias apresentando perda de cristas e corpos lamelares (Figura 13 D). Partículas virais podem ser observadas em maior quantidade no grupo infectado, no entanto também foram encontradas no grupo controle. O trabalho de Borojevic e colaboradores em 1985, que descreve o isolamento dessa linhagem celular, identificou a presença de partículas virais, as quais foram descritas como esféricas e correspondentes à retrovírus em tamanho.

**Figura 13:** Ultraestrutura das células GRX.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Imagens referentes à análise ultraestrutural da linhagem GRX. (A) GRX não infectada (MOCK), com presença de núcleo (N), mitocôndrias (setas), retículo endoplasmático (ponta de setas), vacúolos (v) e Complexo de Golgi (G) e partículas virais (asterisco). (B) GRX infectada pelo ZIKV apresentando núcleo (N), mitocôndria eletrodensa (seta) e inúmeros vacúolos (v). (C) GRX infectada com núcleo (N), retículo endoplasmático dilatado (setas) e vacúolos (v) e partículas virais (seta larga). (D) GRX infectada com núcleo (N), mitocôndrias eletrodensas com perda de cristas (setas) e inúmeros corpos lamelares (L).

## 8.2. A INFEÇÃO PELO ZIKV DIMINUI A VIABILIDADE DAS LINHAGENS CELULARES HEPG2, GRX E LX-2

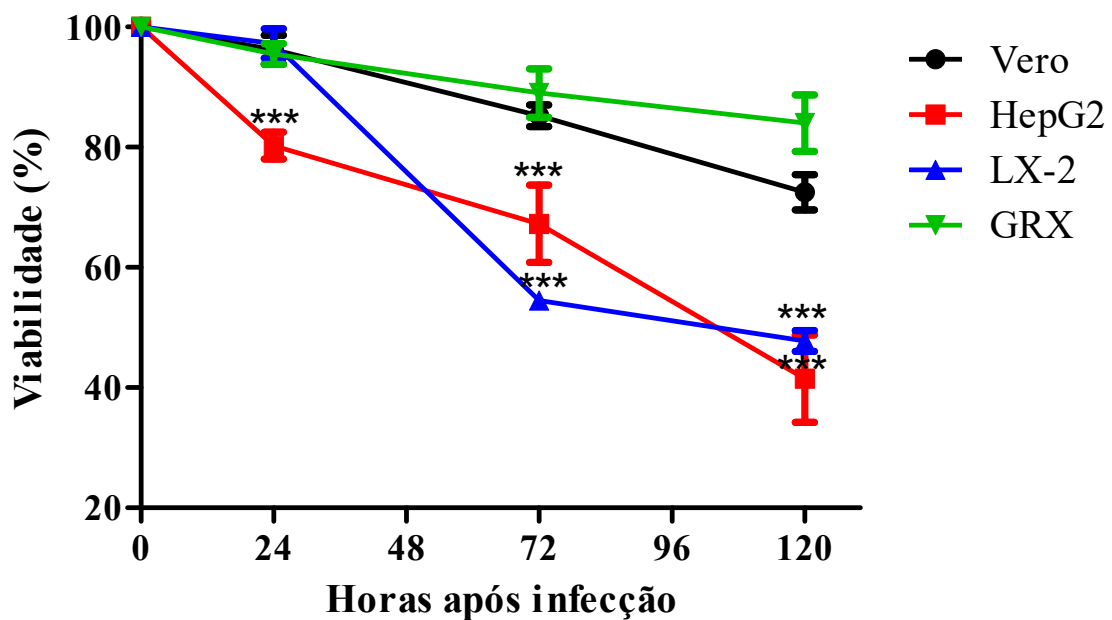
Foi observado que a infecção pelo ZIKV acarretou na diminuição da viabilidade celular das linhagens celulares avaliadas neste trabalho com o decorrer do tempo.

### 8.2.1. Ensaio de XTT

O ensaio de XTT foi realizado para avaliar a sobrevivência das linhagens celulares

após infecção viral. Este ensaio é baseado na mudança de coloração observada no meio resultante da redução extracelular do composto XTT em cristais de formazan solúveis, realizada por células viáveis. Foi observado que a partir das primeiras 24 horas apenas a linhagem HepG2 apresentou diminuição relevante na viabilidade celular (caindo para 80%). Com 72 horas, as linhagens HepG2 e LX-2 apresentaram diminuição mais drástica, com 66 e 54% de viabilidade, respectivamente, enquanto que as demais não demonstraram queda significativa (Figura 14).

**Figura 14:** Curva temporal de viabilidade após infecção pelo ZIKV nas linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX



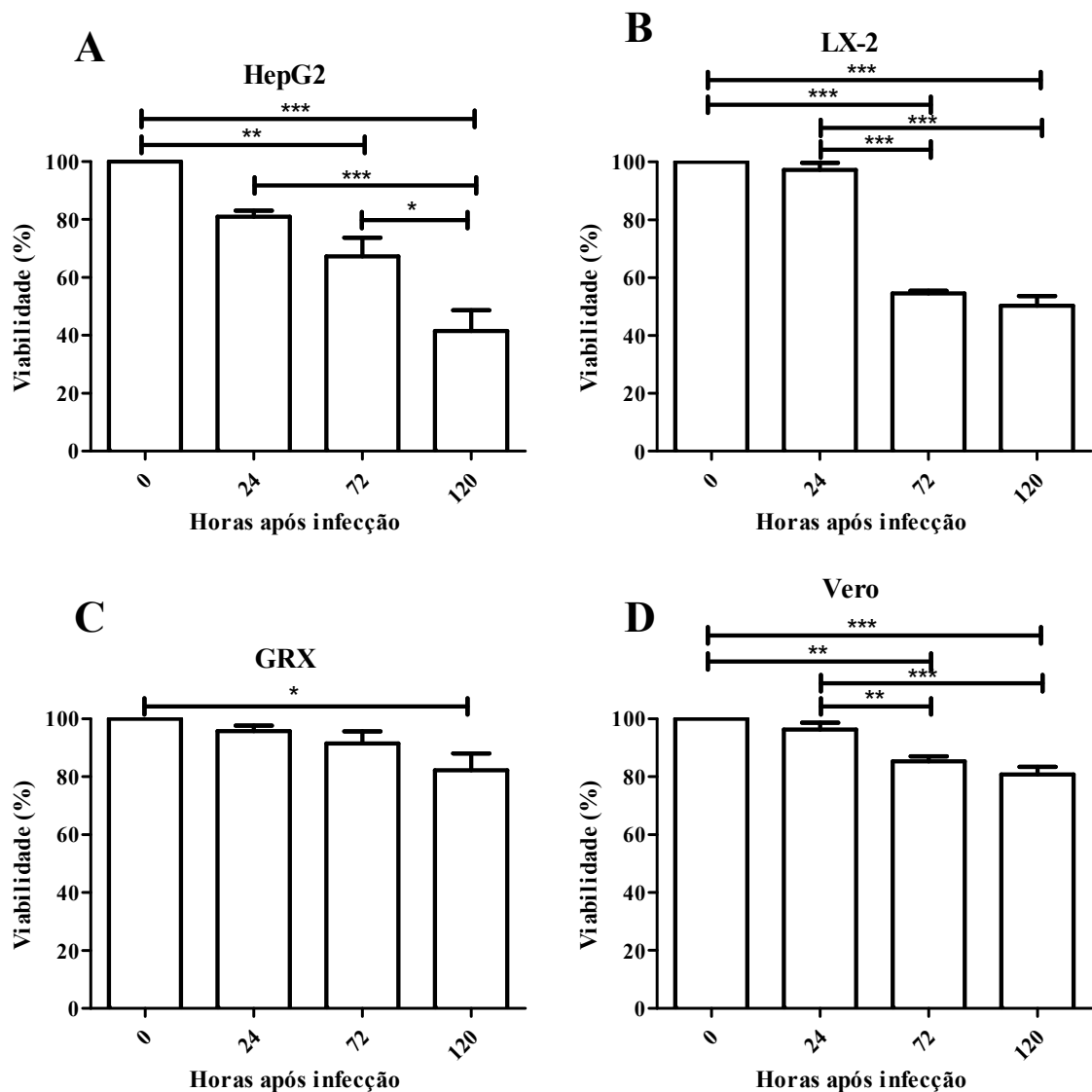
**Fonte:** A autora.

**Nota:** Dados referentes à redução do composto XTT em cristais de formazan solúveis no meio pela enzima NADH presente na mitocôndria de células viáveis após infecção viral, avaliados quanto à intervalo de tempo. Os resultados foram denotados em cores distintas para fácil visualização. Em preto: Linhagem Vero; Em vermelho: Linhagem HepG2; Em azul: Linhagem LX-2; Em verde: Linhagem GRX. Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes em relação à linhagem controle de células VERO em cada intervalo específico (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ).

No último intervalo avaliado (120 horas após infecção), as células apresentaram o mesmo padrão observado anteriormente: HepG2 e LX-2 demonstram ser as linhagens mais prejudicadas (41 e 47%, respectivamente); ao passo que, curiosamente, GRX e Vero apresentam viabilidade acima de 80% (82 e 81%, respectivamente).

Avaliando a curva de cada linhagem ao longo dos intervalos, observa-se que as linhagens HepG2, LX-2 e Vero apresentaram diminuição a partir do intervalo de 72 horas após a infecção (Figura 15 A, B e D, respectivamente); e dentre elas, a LX-2 demonstra queda mais abrupta. Enquanto isso, a linhagem de célula estrelada GRX apresenta uma resposta mais tardia, com uma pequena queda na viabilidade celular apenas após 120 horas (Figura 15 C).

**Figura 15:** Ensaio de viabilidade celular após infecção pelo ZIKV nas linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Dados referentes à redução do composto XTT em cristais de formazan solúveis no meio pela enzima NADH presente na mitocôndria de células viáveis após infecção viral, avaliados quanto à linhagem. Os resultados foram denotados em cores distintas para fácil visualização. **A:** Linhagem HepG2; **B:** Linhagem LX-2; **C:** Linhagem GRX; **D:** Linhagem Vero. Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ).

Considerando os dados, a interação entre as variáveis ‘linhagem celular’ e ‘tempo’ é significativa ( $p < 0,0001$ ) e denota 17,9% da variância total. Ambas as variáveis apresentam efeito sobre o resultado final e refletem 20,4% e 53,1% da variância total do resultado final. Tal efeito é considerado muito significativo e a chance do mesmo resultado ser observado de forma aleatória em um experimento desse tipo é menor que 0,01%.

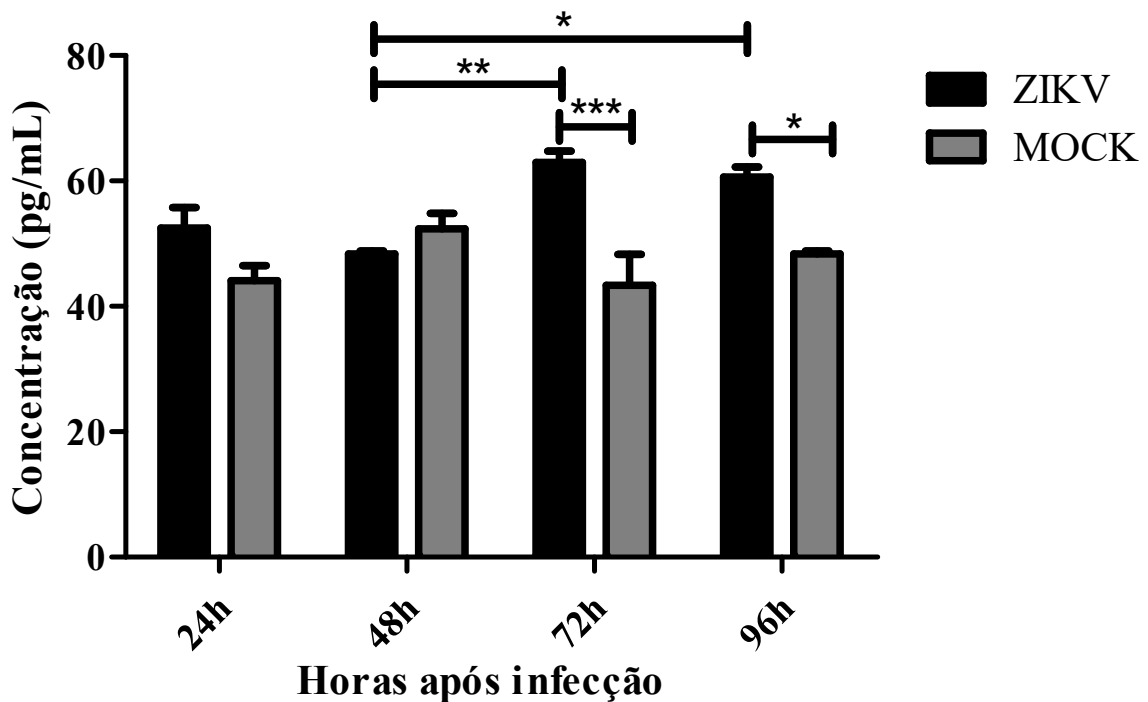
### 8.3. A INFECÇÃO PELO ZIKV ALTERA VIAS DE IMUNOMODULAÇÃO DO REPARO HEPÁTICO NAS LINHAGENS CELULARES HEPG2, LX-2 E GRX

Foi observado que a infecção pelo ZIKV alterou algumas vias de citocinas pró-inflamatórias/pró-fibrogênicas relacionadas à imunomodulação após infecção pelo ZIKV.

#### 8.3.1. Citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1:

A concentração da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1 foi quantificada a partir do sobrenadante de células das linhagens HepG2, LX-2 e GRX infectadas e controles (MOCK) nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h. Na linhagem de hepatócitos foi observado aumento na produção de TGF- $\beta$ 1 a partir de 72 horas de infecção (Figura 16), enquanto que, no controle, as células apresentaram concentrações aproximadas em todos os intervalos avaliados (em média, 47 pg/ml).

**Figura 16:** ELISA sanduíche da citocina TGF- $\beta$ 1 da linhagem HepG2.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gráfico produzido utilizando o GraphPad Prism Versão 5.1. Concentrações de TGF- $\beta$ 1 em pg/mL nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h na linhagem de hepatócitos HepG2. As colunas pretas se referem às células infectadas, enquanto as cinzas, às células controle (MOCK – sem infecção). Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes (\*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \* =  $p < 0.05$ ).

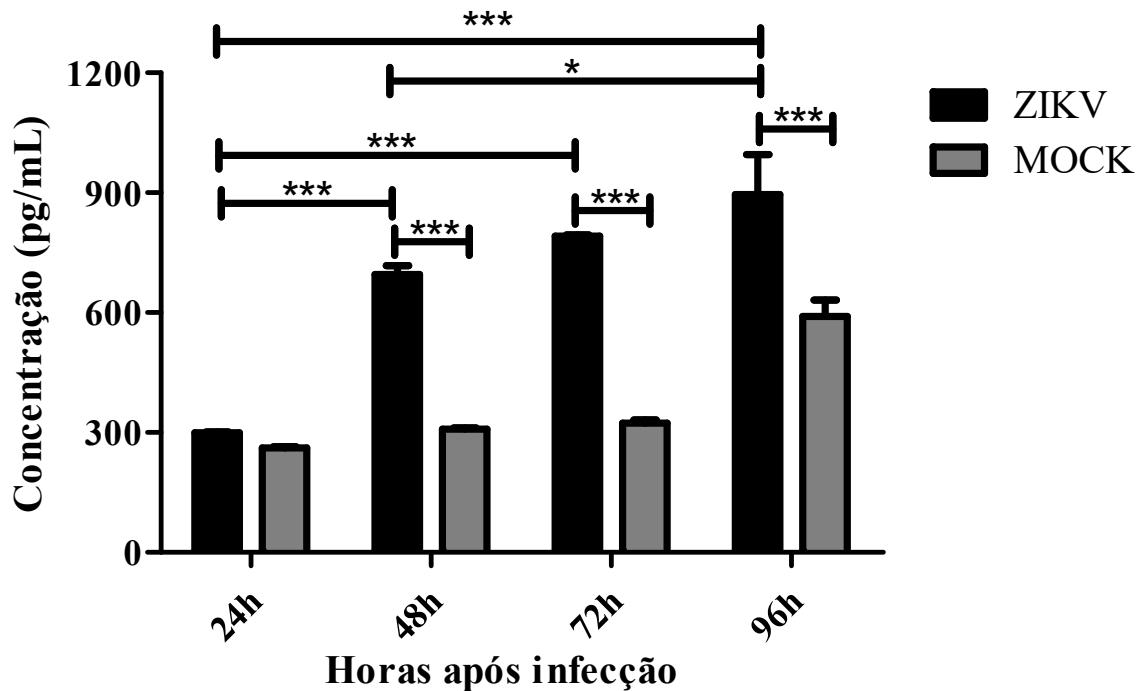
Nas células HepG2 infectadas, observa-se que a produção inicial de TGF- $\beta$ 1 de, em média, 47,8 pg/ml, elevou-se para 60,9 pg/ml no intervalo de 72 horas e manteve valores aproximados em 96 horas. Já nas células controle, podemos observar que as concentrações se mantiveram semelhantes em todos os intervalos avaliados, com média de 47 pg/ml.

A interação entre as variáveis ‘tempo’ e ‘infecção’ é significativa ( $p < 0,0001$ ) e denota 23,3% da variância total do resultado observado para produção de TGF- $\beta$ 1 pelas células HepG2. O tempo transcorrido não teve efeito independente no resultado final, denotando 7,6% da variância total, enquanto que a infecção tem efeito significativo sobre o resultado final e é responsável por 26,3% da variância total. Caso não houvesse efeito, existe 0,001% de chance do mesmo resultado ser observado aleatoriamente em um experimento assim.

Quanto à linhagem LX-2, foi observado aumento gradual na produção de TGF- $\beta$ 1 a partir de 48 horas após infecção (Figura 17). Enquanto que as células do grupo controle só apresentaram algum aumento na concentração da citocina após 96 horas de cultivo.



**Figura 17:** ELISA sanduíche da citocina TGF- $\beta$ 1 da linhagem LX-2.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gráfico produzido utilizando o GraphPad Prism Versão 5.1. Concentrações de TGF- $\beta$ 1 em pg/mL nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h na linhagem de células estreladas humanas LX-2. As colunas pretas se referem às células infectadas, enquanto as cinzas, às células controle (MOCK – sem infecção). Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; (\*) =  $p < 0.05$ ).

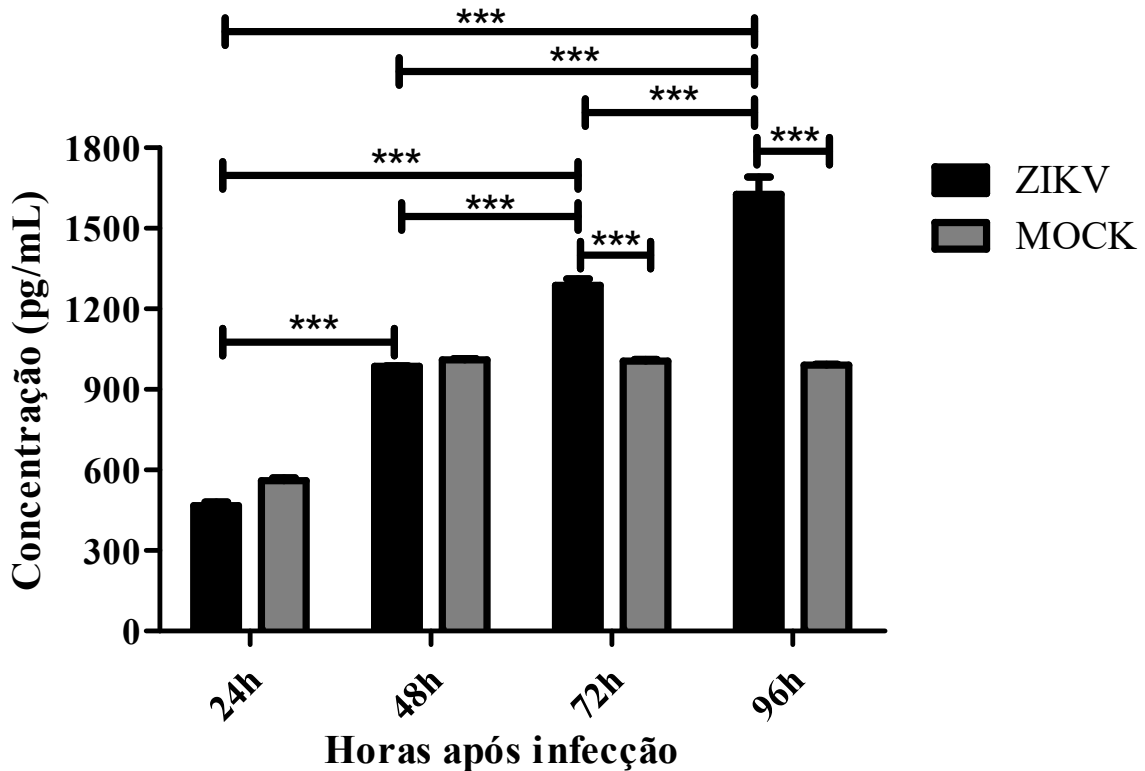
No primeiro intervalo, tanto as células LX-2 infectadas quanto as células controles apresentaram concentrações aproximadas, de 280 pg/ml, em média. Durante os intervalos de 48 e 72 horas, pode-se observar que as células infectadas produziram, em média, 235% a mais do que foi observado no controle (743,9 e 315,9 pg/ml, respectivamente). Já no último intervalo, as células infectadas produziram cerca de 979,8 pg/ml, enquanto que as células não infectadas só apresentaram aumento na concentração dessa citocina nesse intervalo (média de 590 pg/ml).

Após análise, observou-se que a interação entre as variáveis ‘tempo’ e ‘infecção’ é significativa ( $p < 0,0001$ ), representando 10,2% da variância total. Tanto o tempo quanto a infecção têm efeito sobre o resultado final, representando 42,6 e 35,2 da variância total, respectivamente. Existe menos de 0,01% de chance do mesmo resultado ser observado de forma aleatória em um experimento desse tipo.

De forma semelhante ao perfil observado na LX-2, a linhagem GRX apresentou crescimento gradual na produção da citocina TGF- $\beta$ 1 após infecção pelo ZIKV no decorrer dos intervalos observados (Figura 18), enquanto que as células controles demonstraram

aumento na concentração da citocina após 48 horas, mantendo valores aproximados nos demais períodos.

**Figura 18:** ELISA sanduíche da citocina TGF- $\beta$ 1 da linhagem GRX.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gráfico produzido utilizando o GraphPad Prism Versão 5.1. Concentrações de TGF- $\beta$ 1 em pg/mL nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h na linhagem de células estreladas murinas GRX. As colunas pretas se referem às células infectadas, enquanto as cinzas, às células controle (MOCK – sem infecção). Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes (\*\*\*) =  $p < 0.001$ .

É possível observar que a concentração da citocina nas células GRX infectadas no primeiro intervalo avaliado é semelhante ao observado nas células controle (em média 514 pg/ml). Até o período de 48 horas as concentrações da citocina se mantêm aproximados entre os dois grupos, em média de 998,2 pg/ml. A partir do intervalo de 72 horas, o grupo infectado se destaca, produzindo 1287,3 pg/ml de TGF- $\beta$ 1, comparando à 1000,8 pg/ml do controle. A tendência de aumento se mantém no último intervalo, com média de 1626,7 pg/ml no grupo infectado, enquanto o grupo controle continua com valores aproximados aos anteriores.

Foi observado que, para a produção de TGF- $\beta$ 1 pela linhagem GRX, a interação entre as variáveis ‘tempo’ e ‘infecção’ é significativa ( $p < 0,0001$ ) e denota 17% da variância total. Além disso, ambas as variáveis têm efeito sobre o resultado final observado, sendo o tempo

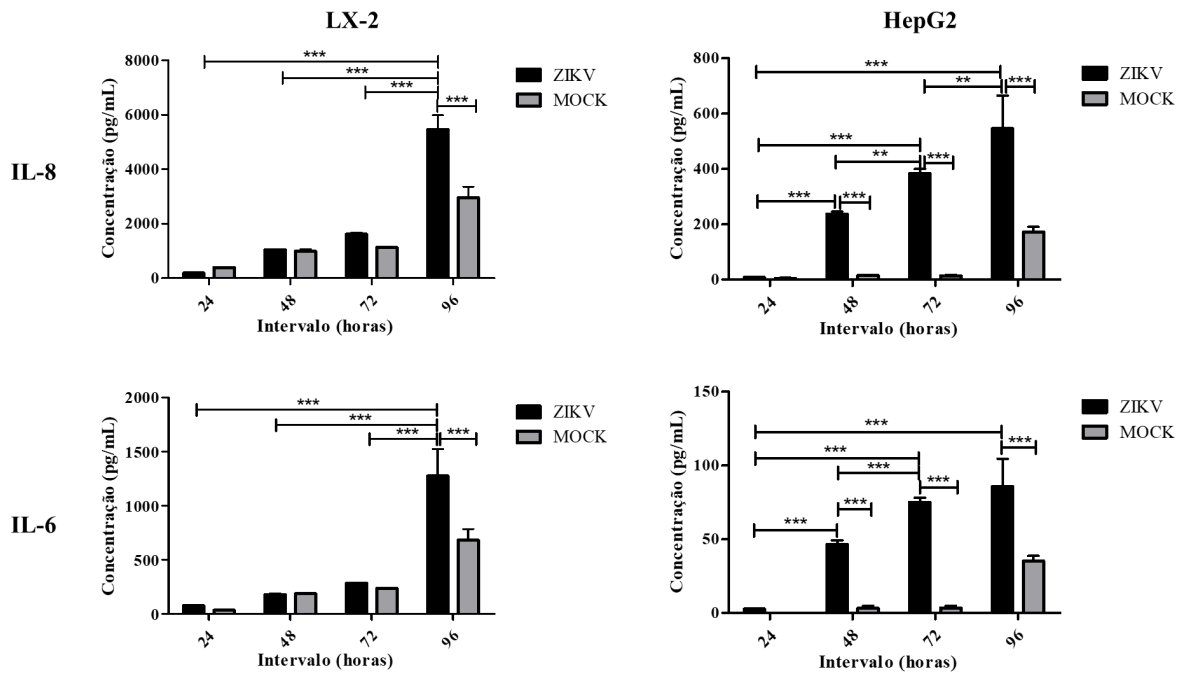
responsável por 72,2% da variância total, e infecção, 8,16%. Se eles não tivessem efeito algum sobre o resultado, a chance do mesmo ser observado em um experimento desse tipo de forma aleatória seria menor do que 0,01%.

Comparando as três linhagens avaliadas entre si podemos observar que as duas linhagens de células estreladas hepáticas produzem a citocina TGF- $\beta$ 1 em maior quantidade quando comparadas à linhagem de hepatócitos HepG2 (a GRX cerca de 40 vezes mais e LX-2, 24 vezes mais). Além disso, o perfil de resposta da HepG2 à infecção viral pelo ZIKV pode ser considerado mais tardio, tendo em vista que a diferença entre os valores no grupo infectado foi observada apenas após 72 horas, enquanto que ambas as células estreladas apresentaram aumento na produção da citocina a partir de 48 horas de infecção. Contrapondo apenas as células estreladas entre si, a GRX produz maiores concentrações da citocina do que a LX-2, cerca de 1,5 vezes mais.

### **8.3.2. Citocinas Inflamatórias**

Foi realizada a dosagem de citocinas inflamatórias no sobrenadante de células da linhagem HepG2, LX-2 e GRX infectadas e controles (MOCK) nos intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h; na qual IL-6 e IL-8 foram detectadas nas linhagens HepG2 e LX-2 (Figura 19). As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 avaliadas pela técnica de CBA apresentaram valores abaixo do limite de detecção e, portanto, não foram quantificadas.

**Figura 19:** Dosagem de IL-6 e IL-8 nas linhagens LX-2 e HepG2.

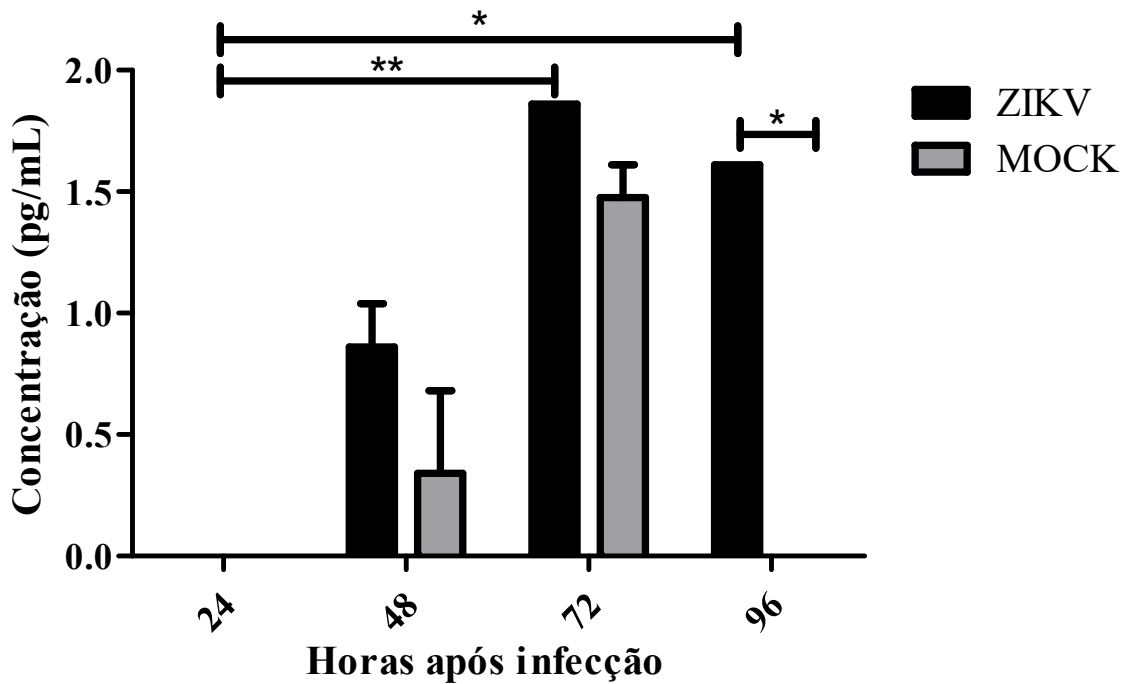


**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gráfico produzido utilizando o GraphPad Prism Versão 5.1. Concentrações de IL-8 e IL-6 em pg/mL nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h. As barras pretas se referem às linhagens celulares infectadas (ZIKV), enquanto os cinzas, às células controle sem infecção (MOCK). Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes entre os intervalos ou entre os grupos infectado e controle (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ).

Observando atentamente os gráficos dispostos, podemos observar que a linhagem LX-2 produz as citocinas em questão com cerca de 10 vezes mais intensidade do que a HepG2. A linhagem LX-2 apresentou aumento significativo na produção das citocinas IL-6 e IL-8 apenas no quinto dia após infecção. Além disso, as células HepG2 demonstraram aumento sucessivo na produção das citocinas a partir das primeiras 48 horas após infecção, sugerindo uma resposta mais gradual frente à infecção viral, enquanto que a LX-2 apresentou uma resposta mais robusta, no entanto mais tardia. Quanto à linhagem GRX, apenas a citocina IL-8 apresentou valores quantificáveis (Figura 20).

**Figura 20:** Dosagem de IL-8 na linhagem GRX.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gráfico produzido utilizando o GraphPad Prism Versão 5.1. Concentrações de IL-8 em pg/mL nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h. As barras pretas se referem às linhagens celulares infectadas (ZIKV), enquanto as cinzas, às células controle sem infecção (MOCK). Asteriscos denotam dados estatisticamente significantes entre os intervalos ou entre os grupos infectado e controle (\*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ).

É possível observar que a linhagem GRX produz por volta de 4000 vez menos IL-8 quando comparada à LX-2, de origem humana. Além disso, o padrão de resposta mostra-se distinto: enquanto a LX-2 responde mais tardiamente à infecção, a linhagem GRX apresenta produção significativa de IL-8 a partir do terceiro dia de infecção.

## 9. DISCUSSÃO

Após a epidemia mundial de 2015, o ZIKV emergiu como um problema de saúde pública, estimulando o surgimento de inúmeras pesquisas. Apesar de descrito desde 1952, ainda são vagos os estudos sobre tropismo do vírus no fígado, possíveis efeitos sinérgicos e mecanismos do ZIKV associados a doenças hepáticas pré-estabelecidas. Estudos *in vivo* demonstraram que o RNA viral pode ser detectado no fígado de camundongos imunodeprimidos e macacos após infecção experimental (DOWALL et al., 2016; ADAMS WALDORF et al., 2016). Também já foi relatada inflamação severa no fígado de embriões de galinha e camundongos imunodeprimidos decorrente de infecção em laboratório, tendo sido observado aspectos similares aos de hepatite (ZHANG et al., 2019).

No presente estudo, foi descrito a replicação do ZIKV e seus impactos em hepatócitos e CEHs. As linhagens de células hepáticas se mostraram permissivas à infecção pela cepa circulante de ZIKV no estado de Pernambuco. A linhagem de hepatócitos humanos apresentou títulos virais semelhantes aos observados na cultura de células Vero, que são usadas para amplificação viral em laboratório, sugerindo também um potencial biotecnológico para essa linhagem. A infecção de hepatócitos pelo ZIKV já foi descrita anteriormente na literatura. No trabalho de Sherman e colaboradores em 2019 foi observado aumento nos valores de RNA viral presente no sobrenadante de cultura de HepG2 e Huh 7.5 (caracterizado como linhagem derivada de hepatocarcinoma celular) a partir do dia 1 após infecção. Através do ensaio de viabilidade celular foi possível observar que, as células HepG2 apresentaram sobrevivência de apenas 40% após 120 horas de infecção, o que também é demonstrado na avaliação do efeito citopático, no qual poderemos observar morte celular severa. Além disso, observamos que a infecção estimulou a produção de IL-6 e IL-8 48 horas, assim como da citocina TGF- $\beta$ 1 após 72 horas da infecção pelo ZIKV.

As células HepG2 já foram utilizadas em estudos que avaliaram a infecção por flavivírus. Trabalhos utilizando o DENV observaram que essa linhagem suporta a infecção, com titulações virais detectáveis antes das primeiras 24 horas para todos os sorotipos (THEPARITT et al., 2004), com produção de metaloproteinasas (SEANPONG et al., 2015). Também já foi descrito que, quando infectadas pelo YFV, geram progênie viral a partir de 24 horas, expressão aumentada de genes envolvidos na apoptose e das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 (LEFEUVRE et al., 2006; HOLANDA et al., 2019). Um dos mecanismos patogênicos do ZIKV consiste em estimular a autofagia celular, através do

estresse no retículo endoplasmático para formar complexos replicativos, incitado pelas proteínas não estruturais NS4A e NS4B (CHIRAMEL & BEST, 2018). Além disso, outros processos foram descritos, tais quais a entrada via receptores de lectina tipo-C ou lipídeos negativamente carregados (AGRELLI et al., 2019).

Esse é o primeiro trabalho a descrever a infecção das CEHs pelo ZIKV. Foi observado que ambas as linhagens produzem títulos virais detectáveis, no entanto, em menores quantidades quando comparadas às demais linhagens avaliadas. Apesar disso, foi observado que CEHs produziram vírions de forma constante durante todo o período avaliado, e no caso da GRX, sem apresentar nenhum tipo de efeito citopático, demonstrando infecção contínua sem indução de citólise. Os achados de viabilidade celular corroboram essa hipótese, pois demonstram que ambas as linhagens são afetadas pelo vírus, porém, as células GRX em menor grau (apresentando 80% de viabilidade apenas no intervalo de 120 horas após infecção). Tal fato revela que o ZIKV é capaz de infectar essas células de forma persistente, sugerindo um possível reservatório viral no corpo humano, o que é significativo, tendo em vista que pode acarretar na transmissão viral por períodos prolongados. Além disso, tendo em vista que a linhagem GRX já é infectada, demonstra que essas células suportam coinfeção.

A análise ultraestrutural das linhagens Vero, HepG2, LX-2 e GRX demonstrou que essas células sofrem algumas alterações morfológicas em resposta à infecção viral, tais quais vacuolização, hipertrofia do retículo endoplasmático associado a vesículas contendo partículas virais e formação de matrizes tubulares. A partícula viral do ZIKV tem cerca de 50 nm de diâmetro e é composta por um capsídeo cercado por uma bicamada lipídica da célula hospedeira contendo suas proteínas estruturais (SIHORI et al., 2017). O principal mecanismo de entrada do vírus na célula hospedeira é clatrina-dependente. Esse processo consiste na difusão do vírus pela membrana celular até os *hotspots*, onde se iniciará um processo de invaginação e excisão da membrana, seguido da maturação do endossomo até a liberação do genoma viral e tradução no retículo endoplasmático (HACKETT & CHERRY, 2018).

O processo de tradução e clivagem da poliproteína viral induz o rearranjo e invaginação da membrana do retículo endoplasmático em vesículas, que serão os locais de replicação viral, caracterizadas como “fábricas de replicação” (NEUFELDT et al., 2019; PAUL&BARTENSCHLAGER,2013; GILLESPIE et al., 2010). As proteínas não-estruturais NS4A e NS4B do ZIKV desregulam a via AKT-mTOR e induzem a formação de autofagossomos e estimulam a morte celular (LIANG et al., 2016), também descrito para o DENV (WU et al., 2016; HEATON&RANDALL, 2011). Além disso, o processo de autofagia secretória (exossomos), que tem ação protetiva para a célula, pois expulsa proteínas

defeituosas e mantém a homeostase, acarreta na expulsão das partículas virais e está associado a passagem do ZIKV pela barreira placentária (ZHANG et al., 2016). Também foi observado que a autofagia está relacionada à ativação das CEHs ao perfil semelhante à miofibroblastos (WEISKIRCHEN&TACKE, 2019; HERNÁNDEZ-GEA et al., 2012).

O trabalho de Cortese e colaboradores em 2017 com a linhagem HuH7.5 demonstrou que a replicação do ZIKV é dependente do rearranjo do citoesqueleto celular e da estabilidade dos microtúbulos. Além disso, também foi descrito que a droga paclitaxel, estabilizadora dos microtúbulos, suprime a replicação do ZIKV. Já foi observado que a infecção pelo ZIKV acarreta em uma drástica reorganização dos microtúbulos e filamentos intermediários, que formam estruturas ao redor das fábricas de replicação (ZHANG et al., 2019).

Corpos lamelares são organelas relacionadas aos lisossomos devido às similaridades no conteúdo proteico de ambas (WEAVER et al., 2002). Essa organela tem função secretora e seu conteúdo proteico é específico para o tipo celular em que está presente. Estão descritas principalmente nos pneumócitos, células alveolares, queratinócitos e melanócitos, pois produzem e armazenam surfactante pulmonar, melanina e lipídeos (ROSZELL et al., 2012; CHEONG et al., 2007; BOWMAN et al., 2019; ROGER et al., 2019; FEINGOLD, 2012). Ainda não foi bem descrita sua função e conteúdo em células hepáticas, apenas que os hepatócitos apresentam corpos lamelares em maior quantidade quando expostos ao dano por medicamentos *in vivo* (ASAOKA et al., 2013). Também não há trabalhos sobre a possível relação entre o ZIKV e os depósitos de glicogênio, algo que foi observado na linhagem LX-2 pós-infecção.

Alterações nas mitocôndrias foram descritas na infecção pelo DENV. No trabalho de Chatel-Chaix e colaboradores em 2016 observou que a infecção nas células Huh-7 estimulou o alongamento da mitocôndria, associado à formação de subestruturas caracterizadas como membranas convolutas, um ambiente favorável a replicação viral e que inibe a resposta imune celular (SMITH et al., 2017). Já foi descrito que a infecção pelo ZIKV em astrócitos humanos acarretou no prejuízo ao metabolismo mitocondrial e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Acredita-se que o gasto energético para replicação viral leva ao estresse das mitocôndrias e organelas associadas ao processo, como o retículo endoplasmático (LEDUR et al., 2020).

Nas doenças hepáticas crônicas, o acúmulo de ROS acarreta na morte celular dos hepatócitos, que vai estimular o recrutamento de leucócitos e a transdiferenciação das CEHs (LIANG et al., 2016). O estresse do retículo endoplasmático e da mitocôndria leva à produção



de ROS via NADPH oxidase (NOx). Os superóxidos produzidos são rapidamente convertidos em peróxido de hidrogênio pelas enzimas antioxidantes superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT). No entanto, foi descrito que a infecção por flavivírus estimula a expressão de NOx e leva ao acúmulo de ROS (ZHANG et al., 2019). O trabalho de Almeida e colaboradores em 2012 descreveu que o ZIKV induz o aumento de ROS e peroxidação lipídica celular *in vitro*, acompanhado de diminuição de SOD e CAT nas células HepG2 após infecção e *in vivo* no fígado de camundongos C57BL/6.

Além de caracterizar a infecção, o foco desse estudo foi avaliar as alterações na expressão e secreção de fatores envolvidos nos mecanismos da fibrose. Quanto a isso, observou-se aumento da produção da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1 em todas as linhagens avaliadas: nas CEHs, a partir de 48 horas e nos hepatócitos, a partir de 72 horas. Além disso, foi observado que as citocinas proinflamatórias IL-6 e IL-8 foram produzidas em maior quantidade na linhagem de CEHs humanas após 96 horas de infecção. Curiosamente, esse mesmo perfil inflamatório já foi observado em *estudos* realizados com DENV, nos quais foi observada associação entre a elevação dos níveis séricos dessas citocinas e pacientes com quadros mais graves de dengue (MEHTA et al., 2018; IANI et al., 2016). Além disso, esse perfil de resposta à infecção por ZIKV também já foi observado *in vitro* em trabalhos que avaliaram células endoteliais (linhagem HUVEC), PBMCs e células progenitoras neurais, com produção de IL-6 e IL-8 com 24 horas após infecção.

A citocina TGF- $\beta$ 1 já foi amplamente descrita como chave durante o processo de fibrogênese hepática, por ser a principal citocina envolvida na ativação e manutenção do perfil ativado das CEHs (DEWIDAR et al., 2019; FABREGAR et al., 2016; XU et al., 2016). Durante a infecção pelo DENV, altas concentrações de TGF- $\beta$ 1 foram encontradas no plasma de pacientes infectados, associado quadros de dengue moderada e hemorrágica (TILLU et al., 2016; LAUR et al., 1998; AGARWAL et al., 2001). Além disso, foi observado que o fígado de pacientes cuja causa da morte foi a infecção por YFV apresentou maior expressão dessa citocina (QUARESMA et al., 2006). Quanto ao ZIKV, o trabalho de Sousa e colaboradores em 2018 avaliou amostras de tecido cerebral de 5 pacientes fatais de microcefalia induzida pelo ZIKV, nas quais foi observado maiores concentrações de TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-10, em comparação ao grupo controle.

Já foi descrito o envolvimento da citocina pró-inflamatória IL-6 no processo de fibrogênese hepática, cardíaca, renal, muscular e intestinal associada à Doença de Cronh (FRIEDMAN, 2018; KUMAR et al., 2019; CHEN et al., 2019; FORCINA et al., 2019; NIJHUIS et al., 2017). No fígado, essa participação ocorre principalmente através do estímulo

à mecanismos de ativação das CEHs a um fenótipo semelhante à miofibroblastos (KAGAN et al., 2017; XIANG et al., 2017). Sabe-se que as principais fontes celulares de IL-6 durante esse processo são as células progenitoras hepáticas, células do ducto biliar e as próprias CEHs, agindo de forma parácrina e autócrina (TSUCHIDA&FRIEDMAN, 2017; HIGASHI et al., 2017).

O estudo de Shah e colaboradores em 2015 avaliou a associação entre pacientes infectados pelo HCV e IL-6, no qual foi observado que a severidade da fibrose hepática está relacionada à altas concentrações de IL-6 no soro dos pacientes. Dados acerca da participação da IL-6 na resposta imune ao ZIKV ainda são escassos e contraditórios. O trabalho de Tappe e colaboradores em 2016 descreveu que níveis elevados de IL-6 são observados em pacientes com ZIKV nas fases aguda e de recuperação. Essa elevação também foi observada em amostras de colostro de puérperas infectadas (DE QUENTAL et al., 2019). No entanto, o contrário também já foi descrito. No trabalho de Silva e colaboradores em 2019, foram observados valores similares na expressão relativa de IL-6 entre o grupo de pacientes infectados e o controle. Além disso, em 2018 Colavita e colaboradores observou que a infecção pelo ZIKV induz uma resposta pró-inflamatória em PBMCs. No entanto, a elevação de IL-6 e IL-8 foi apenas transiente e não significativa.

A citocina pró-inflamatória IL-8 está principalmente associada à quimiotaxia de granulócitos aos locais de lesão e pode ser produzida por qualquer tipo celular, em especial, os monócitos/macrófagos e células epiteliais (TURNER et al., 2014). Já foi observado que altos de níveis de IL-6 e IL-6 séricos estão envolvidos na exacerbação aguda e quadros mais graves de fibrose pulmonar (PAPIRIS et al., 2018; YANG et al., 2018). Além disso, existem correlações entre os níveis de IL-8 com o processo fibrogênico no pâncreas e glândula prostática, associado à ativação de miofibroblastos (MANOHAR et al., 2017; SCHAUER et al., 2008).

Altas concentrações de IL-8 estão relacionadas à quadros severos de fibrose hepática por NAFLD (GLASS et al., 2018). Além disso, o trabalho de Zimmermann e colaboradores em 2011, avaliou 200 pacientes com doença hepática crônica, nos quais foi encontrado altos níveis séricos dessa citocina, principalmente em pacientes com cirrose avançada. Sua expressão de IL-8 também estava aumentada em monócitos circulantes e amostras de fígado. Ademais, o estudo de Clément e colaboradores em 2010 descreveu um potencial pró-fibrogênico para essa citocina. Foi observado que a expressão de  $\alpha$ -SMA estava aumentada em células da linhagem LX-2 após tratamento com meio de cultura, proveniente de hepatócitos imortalizados (linhagem Huh-7) infectados pelo HBV e a IL-8 foi identificada

como principal indutor.

O envolvimento da citocina IL-8 com a resposta imune aos flavivírus já foi descrito para o DENV em alguns trabalhos. O trabalho de Medin e colaboradores em 2005 observou que as células HepG2 infectadas pelo DENV aumentaram a produção de IL-8, acompanhado de aumento na expressão gênica, estimuladas pela proteína não-estrutural NS5 do vírus. No ano seguinte, esse mesmo grupo observou que esse aumento está associado aos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1 (MEDIN&ROTHMAN, 2006). Além disso, estudos avaliando o soro de pacientes infectados observaram níveis aumentados de IL-8 para todos os sorotipos de DENV (PANDEY et al., 2015; PATRO et al., 2019).

Os achados deste trabalho corroboram os perfis de resposta celular observados em infecções por outros flavivírus, tais quais DENV e YFV. Além disso, traz novos dados em relação à infecção do ZIKV em células hepáticas e sua influência sobre os processos celulares e citocinas envolvidas no processo de reparo e cicatrização hepática.

## 10.CONCLUSÕES

Com base no que foi observado nos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que as linhagens celulares HepG2, LX-2 e GRX são susceptíveis à infecção pelo ZIKV *in vitro*. Além disso, o ZIKV acarretou em mudanças morfológicas a nível ultraestrutural, relacionadas ao estresse celular em resposta ao vírus e levou à perda de viabilidade nessas linhagens. Ademais, também podemos concluir que o ZIKV foi capaz de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênica envolvidas no processo de fibrogênese hepática, indicando que o ZIKV tem potencial de descompensar processos patológicos pré-estabelecidos em pacientes hepatopatas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS WALDORF, Kristina M; STENCEL-BAERENWALD, Jennifer E; KAPUR, Raj P; STUDHOLME, Colin; BOLDENOW, Erica; VORNHAGEN, Jay; BALDESSARI, Audrey; DIGHE, Manjiri K; THIEL, Jeff; MERILLAT, Sean. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 1256-1259, 12 set. 2016.
- AGARWAL; ELBISHBISHI; CHATURVEDI; NAGAR; MUSTAFA. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. **International Journal Of Experimental Pathology**, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 143-149, 25 dez. 2001.
- AGRELLI, Almerinda; MOURA, Ronald Rodrigues de; CROVELLA, Sergio; BRANDÃO, Lucas André Cavalcanti. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 69, p. 22-29, abr. 2019.
- AIZAWA, Yoshio; HOKARI, Atsushi. Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects. **Clinical And Experimental Gastroenterology**, [S.L.], v. 10, p. 9-18, jan. 2017.
- AKIL, Abdellah; ENDSLEY, Mark; SHANMUGAM, Saravanabalaji; SALDARRIAGA, Omar; SOMASUNDERAM, Anoma; SPRATT, Heidi; STEVENSON, Heather L.; UTAY, Netanya S.; FERGUSON, Monique; YI, Minkyung. Fibrogenic Gene Expression in Hepatic Stellate Cells Induced by HCV and HIV Replication in a Three Cell Co-Culture Model System. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 568-579, 24 jan. 2019.
- ALMEIDA, Letícia Trindade; FERRAZ, Ariane Coelho; CAETANO, Camila Carla da Silva; MENEGATTO, Marília Bueno da Silva; ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira; LIMA, Rafaela Lameira Souza; CAMINI, Fernanda Caetano; PEREIRA, Samille Henriques; PEREIRA, Karla Yanca da Silva; SILVA, Breno de Mello. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. **Virus Research**, [S.L.], v. 286, p. 198084, set. 2020.
- ALTAMIRANO-BARRERA, A.; BARRANCO-FRAGOSO, B.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Management strategies for liver fibrosis. **Annals of Hepatology**, [S. L.], v. 16, n. 1, p. 48–56, jan/fev. 2017.
- ANDRADE, Zilton A.. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 514-520, dez. 2005.
- ARAUJO, Thalia Velho Barreto de; RODRIGUES, Laura Cunha; XIMENES, Ricardo Arraes de Alencar; MIRANDA-FILHO, Demócrito de Barros; MONTARROYOS, Ulisses Ramos; MELO, Ana Paula Lopes de; VALONGUEIRO, Sandra; ALBUQUERQUE, Maria de Fátima Pessoa Militão de; SOUZA, Wayner Vieira; BRAGA, Cynthia. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 1356-1363, dez. 2016.
- ASAOKA, Yoshiji; TOGASHI, Yuko; IMURA, Naoko; SAI, Takafumi; MIYOSHI, Tomoya; MIYAMOTO, Yohei. Immunohistochemistry of LAMP-2 and adipophilin for phospholipidosis in liver and kidney in ketoconazole-treated mice. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 65, n. 6, p. 817-823, set. 2013.
- AZEVEDO, Raimunda S.s.; ARAUJO, Marialva T.; MARTINS FILHO, Arnaldo J.; OLIVEIRA, Consuelo S.; NUNES, Bruno T.D.; CRUZ, Ana C.R.; NASCIMENTO, Ana G.P.A.C.; MEDEIROS, Rita C.; CALDAS, Cezar A.M.; ARAUJO, Fernando C.. Zika virus epidemic in Brazil. I. Fatal disease in adults: clinical and laboratorial aspects. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 85, p. 56-64, dez. 2016.

BAI, Qixuan; AN, Jing; WU, Xiaoning; YOU, Hong; MA, Hong; LIU, Tianhui; GAO, Na; JIA, Jidong. HBV promotes the proliferation of hepatic stellate cells via the PDGF-B/PDGFR- $\beta$  signaling pathway in vitro. **International Journal Of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 1443-1450, 4 out. 2012.

BAIOCCHINI, Andrea; MONTALDO, Claudia; CONIGLIARO, Alice; GRIMALDI, Alessio; CORREANI, Virginia; MURA, Francesco; CICCOSANTI, Fabiola; ROTIROTI, Nicolina; BRENNA, Alessia; MONTALBANO, Marzia. Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 0151736, 21 mar. 2016.

BAGASRA, Omar; ADDANKI, Krishna C.; GOODWIN, Gregory R.; HUGHES, Brandon W.; PANDEY, Pratima; MCLEAN, Ewen. Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 679-686, nov. 2017.

BATALLER, Ramón; BRENNER, David A.. Liver fibrosis. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 115, n. 2, p. 209-218, 1 fev. 2005.

BELL, Beth P.; MANOS, M. Michele; ZAMAN, Atif; TERRAULT, Norah; THOMAS, Ann; NAVARRO, Victor J.; DHOTRE, Kathy B.; MURPHY, Rosemary C.; VAN NESS, Grace R.; STABACH, Nicole. The Epidemiology of Newly Diagnosed Chronic Liver Disease in Gastroenterology Practices in the United States: results from population-based surveillance. **The American Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 103, n. 11, p. 2727-2736, nov. 2008.

BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, [S.L.], v. 19, n. 13, p. 20751, 3 abr. 2014.

BOROJEVIC, Radovan; MONTEIRO, Alvaro N. A.; VINHAS, Solange A.; DOMONT, Gilberto B.; MOURÃO, Paulo A. S.; EMONARD, Hervé; GRIMALDI, Gabriel; GRIMAUD, Jean-Alexis. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 382-390, jul. 1985.

BÖTTCHER, Katrin; PINZANI, Massimo. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 121, p. 3-8, nov. 2017.

BOWMAN, Shanna L.; BI-KARCHIN, Jing; LE, Linh; MARKS, Michael S.. The road to lysosome-related organelles: insights from hermansky :pudlak syndrome and other rare diseases. **Traffic**, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 404-435, 29 maio 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS TABNET - Morbidade hospitalar do SUS/ SIH SUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>. Acesso: 04/07/2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. NOTA INFORMATIVA Nº 19-SEI/2017-SAS/GAB/SAS/MS. Disponível em: [http://cosemspb.org/wp-content/uploads/2018/01/svs-sas-ms\\_notas\\_informativa\\_conjunta\\_05-2017.pdf](http://cosemspb.org/wp-content/uploads/2018/01/svs-sas-ms_notas_informativa_conjunta_05-2017.pdf). Acesso em: 20/04/2020.

BRIANT, Laurence; DESPRÈS, Philippe; CHOUMET, Valérie; MISSÉ, Dorothée. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, [S.L.], v. 464-465, p. 26-32, set. 2014.

CALVET, Guilherme; AGUIAR, Renato s; MELO, Adriana s O; A SAMPAIO, Simone; FILIPPIS, Ivano de; FABRI, Allison; ARAUJO, Eliane s M; SEQUEIRA, Patricia C de;

- MENDONÇA, Marcos C L de; OLIVEIRA, Louisi de. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 653-660, jun. 2016.
- CAO-LORMEAU, Van-Mai; BLAKE, Alexandre; MONS, Sandrine; LASTÈRE, Stéphane; ROCHE, Claudine; VANHOMWEGEN, Jessica; DUB, Timothée; BAUDOUIN, Laure; TEISSIER, Anita; LARRE, Philippe. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, [S.L.], v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, abr. 2016.
- CAO-LORMEAU, Van-Mai; MUSSO, Didier. Emerging arboviruses in the Pacific. **The Lancet**, [S.L.], v. 384, n. 9954, p. 1571-1572, nov. 2014.
- CHAN, Jasper Fuk-Woo; YIP, Cyril Chik-Yan; TSANG, Jessica Oi-Ling; TEE, Kah-Meng; CAI, Jian-Piao; CHIK, Kenn Ka-Heng; ZHU, Zheng; CHAN, Chris Chung-Sing; CHOI, Garnet Kwan-Yue; SRIDHAR, Siddharth. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-12, jan. 2016.
- CHATEL-CHAIX, Laurent; CORTESE, Mirko; ROMERO-BREY, Inés; BENDER, Silke; NEUFELDT, Christopher John; FISCHL, Wolfgang; SCATURRO, Pietro; SCHIEBER, Nicole; SCHWAB, Yannick; FISCHER, Bernd. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 342-356, set. 2016.
- CHEN, Lin H.; WILSON, Mary E.. Zika circulation, congenital syndrome, and current guidelines. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 381-389, out. 2019.
- CHEN, Jian; YANG, Yi-Feng; CHEN, Jun; ZHOU, Xiaohui; DONG, Zhaoguang; CHEN, Tianyue; YANG, Yu; ZOU, Peng; JIANG, Biao; HU, Yunwen. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-7, 1 jan. 2017.
- CHEN, Wei; YUAN, Hui; CAO, Wenmin; WANG, Tianwei; CHEN, Wei; YU, Hang; FU, Yao; JIANG, Bo; ZHOU, Hong; GUO, Hongqian. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation. **Theranostics**, [S.L.], v. 9, n. 14, p. 3980-3991, 31 mai. 2019.
- CHEN, Zhihai; LIU, Lin; LV, Yanning; ZHANG, Wei; LI, Jiandong; ZHANG, Yi; DI, Tian; ZHANG, Shuo; LIU, Jingyuan; LI, Jie. A fatal yellow fever virus infection in China: description and lessons. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-8, 13 jan. 2016.
- CHEONG, Naeun; ZHANG, Huayan; MADESH, Muniswamy; ZHAO, Ming; YU, Kevin; DODIA, Chandra; FISHER, Aron B.; SAVANI, Rashmin C.; SHUMAN, Henry. ABCA3 Is Critical for Lamellar Body Biogenesis in Vivo. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 282, n. 33, p. 23811-23817, 17 ago. 2007.
- CHEW, Kara W.; BHATTACHARYA, Debika. Virologic and immunologic aspects of HIV–hepatitis C virus coinfection. **Aids**, [S.L.], v. 30, n. 16, p. 2395-2404, 23 out. 2016.
- CHIRAMEL, Abhilash I.; BEST, Sonja M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. **Virus Research**, [S.L.], v. 254, p. 34-40, 2 ago. 2018.
- CLÉMENT, Sophie; PASCARELLA, Stéphanie; CONZELMANN, Stéphanie; GONELLE-GISPERT, Carmen; GUILLOUX, Kévin; NEGRO, Francesco. The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 52, n. 5, p. 635-643, mai 2010.

- COELHO, Sharton Vinicius Antunes; NERIS, Rômulo Leão Silva; PAPA, Michelle Premazzi; SCHNELLRATH, Laila Castro; MEUREN, Lana Monteiro; TSCHOEKE, Diogo A.; LEOMIL, Luciana; VERÇOZA, Brunno Renato Farias; MIRANDA, Milene; THOMPSON, Fabiano L.. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 246, p. 65-74, ago. 2017.
- COLAVITA, Francesca; BORDONI, Veronica; CAGLIOTI, Claudia; BIAVA, Mirella; CASTILLETI, Concetta; BORDI, Licia; QUARTU, Serena; IANNETTA, Marco; IPPOLITO, Giuseppe; AGRATI, Chiara. ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I, II, and III IFN Response in Human PBMC. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2018, p. 1-6, 3 jun. 2018.
- CORTESE, Mirko; GOELLNER, Sarah; ACOSTA, Eliana Gisela; NEUFELDT, Christopher John; OLEKSIUK, Olga; LAMPE, Marko; HASELMANN, Uta; FUNAYA, Charlotta; SCHIEBER, Nicole; RONCHI, Paolo. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell Reports**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 2113-2123, 28 fev. 2017.
- COSTA, Federico; SARNO, Manoel; KHOURI, Ricardo; FREITAS, Bruno de Paula; SIQUEIRA, Isadora; RIBEIRO, Guilherme S.; RIBEIRO, Hugo C.; CAMPOS, Gubio S.; ALCÂNTARA, Luiz C.; REIS, Mitermayer G.. Emergence of Congenital Zika Syndrome: viewpoint from the front lines. **Annals Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 164, n. 10, p. 689, 24 fev. 2016.
- COUNOTTE, Michel Jacques; KIM, Caron Rahn; WANG, Jingying; BERNSTEIN, Kyle; DEAL, Carolyn D.; BROUTET, Nathalie Jeanne Nicole; LOW, Nicola. Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: a living systematic review. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 1002611, 24 jul. 2018.
- CRUZ, L.C. Hygino da; NASCIMENTO, O.J.M.; LOPES, F.P.P.L.; SILVA, I.R.F. da. Neuroimaging Findings of Zika Virus–Associated Neurologic Complications in Adults. **American Journal Of Neuroradiology**, [S.L.], v. 39, n. 11, p. 1967-1974, 17 maio 2018.
- DARWISH, Medhat A.; HOOGSTRAAL, Harry; ROBERTS, Thomas J.; AHMED, Ismat P.; OMAR, Ferial. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 77, n. 4, p. 442-445, 1 jan. 1983.
- DENG, Xing; ZHANG, Xin; LI, Weiping; FENG, Ren-Xin; LI, Lu; YI, Gui-Rong; ZHANG, Xiao-Nan; YIN, Chuan; YU, Hong-Yu; ZHANG, Jun-Ping. Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into Hepatocytes. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 114-122, 5 jul. 2018.
- DEVHARE, Pradip B.; SASAKI, Reina; SHRIVASTAVA, Shubham; BISCEGLIE, Adrian M. di; RAY, Ranjit; RAY, Ratna B.. Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 91, n. 6, p. 2225-2241, 15 mar. 2017.
- DEWIDAR; MEYER; DOOLEY; MEINDL-BEINKER. TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1419, 11 nov. 2019.
- DICK, G.W.A; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952.
- DOWALL, Stuart D.; GRAHAM, Victoria A.; RAYNER, Emma; ATKINSON, Barry; HALL, Graham; WATSON, Robert J.; BOSWORTH, Andrew; BONNEY, Laura C.;



- KITCHEN, Samantha; HEWSON, Roger. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 0004658, 5 maio 2016.
- DUDLEY, Dawn M.; NEWMAN, Christina M.; LALLI, Joseph; STEWART, Laurel M.; KOENIG, Michelle R.; WEILER, Andrea M.; SEMLER, Matthew R.; BARRY, Gabrielle L.; ZARBOCK, Katie R.; MOHNS, Mariel S.. Infection via mosquito bite alters Zika virus tissue tropism and replication kinetics in rhesus macaques. **Nature Communications**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 2096, 13 dez. 2017.
- EASTERBROOK, Philippa; JOHNSON, Cheryl; FIGUEROA, Carmen; BAGGALEY, Rachel. HIV and Hepatitis Testing: Global Progress, Challenges, and Future Directions. **Aids Reviews**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 3-14, mar. 2016.
- FABREGAT, Isabel; MORENO-CÁCERES, Joaquim; SÁNCHEZ, Aránzazu; DOOLEY, Steven; DEWIDAR, Bedair; GIANNELLI, Gianluigi; DIJKE, Peter Ten. TGF- $\beta$  signalling and liver disease. **The Febs Journal**, [S.L.], v. 283, n. 12, p. 2219-2232, 22 fev. 2016.
- FEINGOLD, Kenneth R.. Lamellar Bodies: the key to cutaneous barrier function. **Journal Of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 132, n. 8, p. 1951-1953, ago. 2012.
- FORCINA, Laura; MIANO, Carmen; SCICCHITANO, Bianca; MUSARÒ, Antonio. Signals from the Niche: insights into the role of igf-1 and il-6 in modulating skeletal muscle fibrosis. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 232, 11 mar. 2019.
- FOY, Brian D.; KOBYLINSKI, Kevin C.; FOY, Joy L. Chilson; BLITVICH, Bradley J.; ROSA, Amelia Travassos da; HADDOW, Andrew D.; LANCIOTTI, Robert S.; TESH, Robert B.. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 880-882, mai 2011.
- FRANZ, Alexander; KANTOR, Asher; PASSARELLI, A.; CLEM, Rollie. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 3741-3767, 8 jul. 2015.
- FRIEDMAN, Scott L. Hepatic fibrosis—Overview. **Toxicology**, [S.L.], v. 254, n. 3, p. 120-129, 30 dez. 2008.
- GANESAN, Murali; POLUEKTOVA, Larisa; ENWELUZO, Chijioke; KHARBANDA, Kusum; OSNA, Natalia. Hepatitis C Virus-Infected Apoptotic Hepatocytes Program Macrophages and Hepatic Stellate Cells for Liver Inflammation and Fibrosis Development: role of ethanol as a second hit. **Biomolecules**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 113, 13 out. 2018.
- GAO, Bin; JEONG, Won-Il; TIAN, Zhigang. Liver: an organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 729-736, 31 dez. 2007.
- GATSELIS, Nikolaos K. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 60, 7 jan. 2015.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators: VOS, Theo; ALLEN, Christine; ARORA, Megha; BARBER, Ryan M; A BHUTTA, Zulfiqar; BROWN, Alexandria; CARTER, Austin; CASEY, Daniel C; CHARLSON, Fiona J; CHEN, Alan Z et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. **The Lancet**, [S.L.], v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, 8 out. 2016.
- GISSEN, Paul; ARIAS, Irwin M.. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 1023-1037, out. 2015.
- GLASS, Oliver; HENAO, Ricardo; PATEL, Keyur; GUY, Cynthia D.; GRUSS, Hans J.; SYN, Wing-Kin; MOYLAN, Cynthia A.; STREILEIN, Robert; HALL, Russell; DIEHL, Anna Mae. Serum Interleukin-8, Osteopontin, and Monocyte Chemoattractant Protein 1 Are

- Associated With Hepatic Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology Communications**, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 1344-1355, 21 set. 2018.
- GUEDES, Duschinka Rd; PAIVA, Marcelo Hs; DONATO, Mariana Ma; BARBOSA, Priscilla P; KROKOVSKY, Larissa; ROCHA, Sura W dos s; LASARAIVA, Karina; CRESPO, Mônica M; REZENDE, Tatiana Mt; WALLAU, Gabriel L. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-11, 1 jan. 2017.
- GUIDOTTI, Luca G.; CHISARI, Francis V.. IMMUNOBIOLOGY AND PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 23-61, 1 fev. 2006.
- DUFFY, Mark R.; CHEN, Tai-Ho; HANCOCK, W. Thane; POWERS, Ann M.; KOOL, Jacob L.; LANCIOTTI, Robert S.; PRETRICK, Moses; MARFEL, Maria; HOLZBAUER, Stacey; DUBRAY, Christine. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 11 jun. 2009.
- GILLESPIE, Leah K.; HOENEN, Antje; MORGAN, Gary; MACKENZIE, Jason M.. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 84, n. 20, p. 10438-10447, 15 out. 2010.
- GUO, Guang-Hui.; TAN, De-Ming.; ZHU, Ping An.; LIU, Fei. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international**, v. 8, n. 1, p. 59-64, fev. 2009.
- HACKETT, Brent A.; CHERRY, Sara. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 115, n. 16, p. 4246-4251, 2 abr. 2018.
- HANNERS, Natasha W.; EITSON, Jennifer L.; USUI, Noriyoshi; RICHARDSON, R. Blake; WEXLER, Eric M.; KONOPKA, Genevieve; SCHOGGINS, John W.. Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. **Cell Reports**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 2315-2322, 14 jun. 2016.
- HASAN, S. Saif; SEVVANA, Madhumati; KUHN, Richard J.; ROSSMANN, Michael G.. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 13-20, jan. 2018.
- HEATON, Nicholas S.; RANDALL, Glenn. Dengue Virus and Autophagy. **Viruses**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 1332-1341, 4 ago. 2011.
- HERNÁNDEZ-GEA, Virginia; GHIASSI-NEJAD, Zahra; ROZENFELD, Raphael; GORDON, Ronald; FIEL, Maria Isabel; YUE, Zhenyu; CZAJA, Mark J.; FRIEDMAN, Scott L.. Autophagy Releases Lipid That Promotes Fibrogenesis by Activated Hepatic Stellate Cells in Mice and in Human Tissues. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 142, n. 4, p. 938-946, abr. 2012.
- HIGASHI, Takaaki; FRIEDMAN, Scott L.; HOSHIDA, Yujin. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 121, p. 27-42, 1 nov. 2017.
- IANI, Felipe Campos de Melo; ANTONELLI, Lis R.; GOLLOB, Kenneth J.; COSTA, Pedro Augusto Carvalho; DUARTE, Myrian Morato; CALDAS, Sérgio; CECÍLIO, Alzira Batista; CURY, Ana Luisa Furtado. Dengue Patients with Early Hemorrhagic Manifestations Lose Coordinate Expression of the Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 with the Inflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 95, n. 1, p. 193-200, 6 jul. 2016.

- IOOS, Sophie; MALLET, H.-P.; GOFFART, I. Leparc; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M.. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine Et Maladies Infectieuses**, [S.L.], v. 44, n. 7, p. 302-307, 4 jul. 2014.
- IREDALE, John P.; PELLICORO, Antonella; FALLOWFIELD, Jonathan A.. Liver Fibrosis: understanding the dynamics of bidirectional wound repair to inform the design of markers and therapies. **Digestive Diseases**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 310-313, 2 mai. 2017.
- KAGAN, Polina; SULTAN, Maya; TACHLYTSKI, Irina; SAFRAN, Michal; BEN-ARI, Ziv. Both MAPK and STAT3 signal transduction pathways are necessary for IL-6-dependent hepatic stellate cells activation. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 0176173, 4 mai. 2017.
- KIETZMANN, Thomas. Metabolic zonation of the liver: the oxygen gradient revisited. **Redox Biology**, [S.L.], v. 11, p. 622-630, abr. 2017.
- KINDHAUSER, Mary Kay; ALLEN, Tomas; FRANK, Veronika; SANTHANA, Ravi Shankar; DYE, Christopher. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin Of The World Health Organization**, [S.L.], v. 94, n. 9, p. 675-686, 9 fev. 2016.
- KUMAR, Anil; JOVEL, Juan; LOPEZ-OROZCO, Joaquin; LIMONTA, Daniel; AIRO, Adriana M.; HOU, Shangmei; STRYAPUNINA, Iryna; FIBKE, Chad; MOORE, Ronald B.; HOBMAN, Tom C.. Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 5477, 3 abr. 2018.
- KUMAR, Santosh; WANG, Gang; ZHENG, Na; CHENG, Wanwen; OUYANG, Kunfu; LIN, Hairuo; LIAO, Yulin; LIU, Jie. HIMF (Hypoxia-Induced Mitogenic Factor)-IL (Interleukin)-6 Signaling Mediates Cardiomyocyte-Fibroblast Crosstalk to Promote Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. **Hypertension**, [S.L.], v. 73, n. 5, p. 1058-1070, mai. 2019.
- LAUR, Florence; MURGUE, Bernadette; DEPARIS, Xavier; ROCHE, Claudine; CASSAR, Olivier; CHUNGUE, Eliane. Plasma levels of tumour necrosis factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$ -1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 654-656, nov. 1998.
- LEE, Jae; SHIN, Ok. Advances in Zika Virus-Host Cell Interaction: current knowledge and future perspectives. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 1101, 4 mar. 2019.
- LEDUR, Pítia Flores; KARMIRIAN, Karina; PEDROSA, Carolina da Silva Gouveia; SOUZA, Leticia Rocha Quintino; ASSIS-DE-LEMOS, Gabriela; MARTINS, Thiago Martino; FERREIRA, Jéssica de Cassia Cavalheiro Gomes; REIS, Gabriel Ferreira de Azevedo; SILVA, Eduardo Santos; SILVA, Débora. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1228, 27 jan. 2020.
- LEFEUVRE, Anabelle; CONTAMIN, Hugues; DECELLE, Thierry; FOURNIER, Christophe; LANG, Jean; DEUBEL, Vincent; MARIANNEAU, Philippe. Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 1530-1538, mai. 2006.
- LIANG, Qiming; LUO, Zhifei; ZENG, Jianxiong; CHEN, Weiqiang; FOO, Suan-Sin; LEE, Shin-Ae; GE, Jianning; WANG, Su; GOLDMAN, Steven A.; ZLOKOVIC, Berislav V.. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 663-671, 3 nov. 2016.

- LIANG, Shuang; KISSELEVA, Tatiana; BRENNER, David A.. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 7, p. 17, 2 fev. 2016.
- LOWE, Rachel; BARCELLOS, Christovam; BRASIL, Patrícia; CRUZ, Oswaldo; HONÓRIO, Nildimar; KUPER, Hannah; CARVALHO, Marília. The Zika Virus Epidemic in Brazil: from discovery to future implications. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 96, 9 jan. 2018.
- LUEDDE, Tom; KAPLOWITZ, Neil; SCHWABE, Robert F.. Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease: mechanisms and clinical relevance. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 147, n. 4, p. 765-783, out. 2014.
- MACHAIN-WILLIAMS, Carlos; TALAVERA-AGUILAR, Lourdes; CETINA-TREJO, Rosa Carmina; CARRILLO-NAVARRETE, Jaquelin; RIVERO-CÁRDENAS, Nubia; SALAZAR, Ma. Isabel; FARFÁN-ALE, José Arturo; PUERTO, Fernando I.; CASTRO-MUSSOT, María Eugenia. Detection of Hepatitis C Virus Coinfection in Patients with Dengue Diagnosis. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2014, p. 1-5, 14 maio 2014.
- MANOHAR, Murli; VERMA, Alok Kumar; VENKATESHAIHAH, Sathisha Upparahalli; SANDERS, Nathan L; MISHRA, Anil. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. **World Journal Of Gastrointestinal Pharmacology And Therapeutics**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 10, 6 fev. 2017.
- MANSUY, Jean Michel; DUTERTRE, Marine; MENGELLE, Catherine; FOURCADE, Camille; MARCHOU, Bruno; DELOBEL, Pierre; IZOPET, Jacques; MARTIN-BLONDEL, Guillaume. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen?. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 405, abr. 2016.
- MARCELLIN, Patrick; KUTALA, Blaise K.. Liver diseases: a major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. **Liver International**, [S.L.], v. 38, p. 2-6, fev. 2018.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A.. Isolation of Zika Virus from Aedes Aegypti Mosquitoes in Malaysia \*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 411-415, 1 mai. 1969.
- MARTÍN-VÍLCHEZ, Samuel; SANZ-CAMENO, Paloma; RODRÍGUEZ-MUÑOZ, Yolanda; MAJANO, Pedro L.; MOLINA-JIMÉNEZ, Francisca; LÓPEZ-CABRERA, Manuel; MORENO-OTERO, Ricardo; LARA-PEZZI, Enrique. The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells. **Hepatology**, [S.L.], v. 47, n. 6, p. 1872-1883, jun. 2008.
- MEAD, Paul S.; HILLS, Susan L.; BROOKS, John T.. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 39-44, fev. 2018a.
- MEAD, Paul S.; DUGGAL, Nisha K.; HOOK, Sarah A.; DELOREY, Mark; FISCHER, Marc; MCGUIRE, Dana Olzenak; BECKSTED, Heidi; MAX, Ryan J.; ANISHCHENKO, Michael; SCHWARTZ, Amy M.. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 378, n. 15, p. 1377-1385, 12 abr. 2018b.
- MEDIN, Carey L.; FITZGERALD, Katherine A.; ROTHMAN, Alan L.. Dengue Virus Nonstructural Protein NS5 Induces Interleukin-8 Transcription and Secretion. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 79, n. 17, p. 11053-11061, set. 2005.
- MEDIN, Carey L.; ROTHMAN, Alan L.. Cell Type-Specific Mechanisms of Interleukin-8 Induction by Dengue Virus and Differential Response to Drug Treatment. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 193, n. 8, p. 1070-1077, 15 abr. 2006.

MEHTA, V. K.; VERMA, R.; GARG, R. K.; MALHOTRA, H.; SHARMA, P.; A JAIN, A. Study of interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with neurological manifestations of dengue. **Journal Of Postgraduate Medicine**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 11, 2017.

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S.. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 134-142, 8 fev. 2017.

MUSSO, Didier; NHAN, Tuxuan; ROBIN, Emilie; ROCHE, Claudine; BIERLAIRE, Damien; ZISOU, Karen; YAN, Aurore Shan; CAO-LORMEAU, Van Mai; BROULT, Julien. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 19, n. 14, p. 20761, 10 abr. 2014.

MUSSO, Didier; NILLES, Eric J.; CAO-LORMEAU, Van Mai. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 20, n. 10, p. 595-596, 4 out. 2014.

MUSSO, Didier; ROCHE, Claudine; ROBIN, Emilie; NHAN, Tuxuan; TEISSIER, Anita; CAO-LORMEAU, Van-Mai. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 359-361, fev. 2015.

NASCIMENTO, Gilmar Lima; PEGADO, Helio Milani; DOMINGUES, Ana Lúcia Coutinho; XIMENES, Ricardo Arraes de Alencar; ITRIA, Alexander; CRUZ, Luciane Nascimento; OLIVEIRA, Maria Regina Fernandes de. The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 114, p. 180347, 14 jan. 2019.

NEGASH, Amina A.; GALE, Michael. Hepatitis regulation by the inflammasome signaling pathway. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 265, n. 1, p. 143-155, 16 abr. 2015.

NELWAN, Martin L. Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. **Current Therapeutic Research**, [S.L.], v. 91, p. 5-9, 22 jun. 2019.

NEUFELDT, Christopher J.; CORTESE, Mirko; SCATURRO, Pietro; CERIKAN, Berati; WIDEMAN, Jeremy G.; TABATA, Keisuke; MORAES, Thaís; OLEKSIUK, Olga; PICHLMAIR, Andreas; BARTENSCHLAGER, Ralf. ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 2416-2429, 21 out. 2019.

NIJHUIS, Anke; CURCIARELLO, Renata; MEHTA, Shameer; FEAKINS, Roger; BISHOP, Cleo L.; LINDSAY, James O.; SILVER, Andrew. MCL-1 is modulated in Crohn's disease fibrosis by miR-29b via IL-6 and IL-8. **Cell And Tissue Research**, [S.L.], v. 368, n. 2, p. 325-335, 11 fev. 2017.

NIKOLAY, Alexander; CASTILHO, Leda R.; REICHL, Udo; GENZEL, Yvonne. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. **Vaccine**, [S.L.], v. 36, n. 22, p. 3140-3145, 24 maio 2018.

NORTON, P. A.; REIS, H. M. G. P. V.; PRINCE, S.; LARKIN, J.; PAN, J.; LIU, J.; GONG, Q.; ZHU, M.; FEITELSON, M. A.. Activation of fibronectin gene expression by hepatitis B virus x antigen. **Journal Of Viral Hepatitis**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 332-341, jul. 2004.

OLSON, J.G.; KSIAZEK, T.G.; SUHANDIMAN; TRIWIBOWO. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 389-393, 1 jan. 1981.

Pan American Health Organization; World Health Organization. Increase of microcephaly in the northeast of Brazil. **Epidemiological Alert**. Nov, 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-nov-17-cha-microcephaly-epi-alert.pdf>

Pan American Health Organization; World Health Organization. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. **Epidemiological Alert**. Dec, 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf>

PANDEY, Nidhi; JAIN, Amita; GARG, R. K.; KUMAR, Rashmi; AGRAWAL, O. P.; RAO, P. V. Lakshmana. Serum levels of IL-8, IFN $\gamma$ , IL-10, and TGF  $\beta$  and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 160, n. 6, p. 1463-1475, 10 abr. 2015.

PAPIRIS, Spyros A.; TOMOS, Ioannis P.; KARAKATSANI, Anna; SPATHIS, Aris; KORBILA, Ioanna; ANALITIS, Antonis; KOLILEKAS, Likurgos; KAGOURIDIS, Konstantinos; LOUKIDES, Stylianos; KARAKITSOS, Petros. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations. **Cytokine**, [S.L.], v. 102, p. 168-172, fev. 2018.

PAROLA, Maurizio; PINZANI, Massimo. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. **Molecular Aspects Of Medicine**, [S.L.], v. 65, p. 37-55, fev. 2019.

PATRO, A. Raj Kumar; MOHANTY, Sriprasad; PRUSTY, Birendra K.; SINGH, Diwakar K.; GAIKWAD, Sagar; SASWAT, Tanuja; CHATTOPADHYAY, Soma; DAS, Bidyut K.; TRIPATHY, Rina; RAVINDRAN, Balachandran. Cytokine Signature Associated with Disease Severity in Dengue. **Viruses**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 34, 8 jan. 2019.

PAUL, David. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. **World Journal Of Virology**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 32-48, 12 mai. 2013.

AWITWAR, Shashank S.; DHAR, Supurna; TIWARI, Sneham; OJHA, Chet Raj; LAPIERRE, Jessica; MARTINS, Kyle; RODZINSKI, Alexandra; PARIRA, Tiyash; PAUDEL, Iru; LI, Jiaojiao. Overview on the Current Status of Zika Virus Pathogenesis and Animal Related Research. **Journal Of Neuroimmune Pharmacology**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 371-388, 25 abr. 2017.

PELLICORO, Antonella; RAMACHANDRAN, Prakash; IREDALE, John P.; FALLOWFIELD, Jonathan A.. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 181-194, 25 fev. 2014.

PIMPIN, Laura; CORTEZ-PINTO, Helena; NEGRO, Francesco; CORBOULD, Emily; LAZARUS, Jeffrey V.; WEBBER, Laura; SHERON, Nick. Burden of liver disease in Europe: epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 718-735, set. 2018.

POPOV, Yury; SCHUPPAN, Detlef. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies. **Hepatology**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 1294-1306, 15 jun. 2009.

PUCHE, Juan E.; SAIMAN, Yedidya; FRIEDMAN, Scott L.. Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. **Comprehensive Physiology**, [S.L.], p. 1473-1492, 22 out. 2013.

QUARESMA, Juarez A.s.; BARROS, Vera L.R.s.; PAGLIARI, Carla; FERNANDES, Elaine R.; GUEDES, Fernanda; TAKAKURA, Cleusa F.H.; ANDRADE, Heitor F.; VASCONCELOS, Pedro F.C.; DUARTE, Maria I.s.. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with tgf- $\beta$ , tnf- $\alpha$  and nk cells activity. **Virology**, [S.L.], v. 345, n. 1, p. 22-30, 5 fev. 2006.

QUENTAL, Ocilma B. de; FRANÇA, Eduardo L.; HONÓRIO-FRANÇA, Adenilda C.; MORAIS, Tassiane C.; DABOIN, Blanca E. G.; BEZERRA, Italla M. P.; KOMNINAKIS,

- Shirley V.; ABREU, Luiz C. de. Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum. **Journal Of Immunology Research**, [S.L.], v. 2019, p. 1-9, 15 nov. 2019.
- RACANELLI, Vito; REHERMANN, Barbara. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 54-62, fev. 2006.
- REEVES, Helen L.; FRIEDMAN, Scott L Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 808-826, 1 abr. 2002.
- ROGER, Mathilde; FULLARD, Nicola; COSTELLO, Lydia; BRADBURY, Steven; MARKIEWICZ, Ewa; O'REILLY, Steven; DARLING, Nicole; RITCHIE, Pamela; MÄÄTTÄ, Arto; KARAKESISOGLOU, Iakowos. Bioengineering the microanatomy of human skin. **Journal Of Anatomy**, [S.L.], v. 234, n. 4, p. 438-455, 10 fev. 2019.
- ROSZELL, Blair R.; TAO, Jian-Qin; YU, Kevin J.; HUANG, Shaohui; BATES, Sandra R.. Characterization of the Niemann-Pick C pathway in alveolar type II cells and lamellar bodies of the lung. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [S.L.], v. 302, n. 9, p. 919-932, 1 maio 2012.
- A ROTH,; A MERCIER,; LEPERS, C; HOY, D; DUITUTURAGA, S; BENYON, E; GUILLAUMOT, L; SOUARÈS, Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 19, n. 41, p. 20929, 16 out. 2014.
- ROWE, Ian A.. Lessons from Epidemiology: the burden of liver disease. **Digestive Diseases**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 304-309, 2017.
- SAIZ, Juan-Carlos; MARTÍN-ACEBES, Miguel A.; BUENO-MARÍ, Rubén; SALOMÓN, Oscar D.; VILLAMIL-JIMÉNEZ, Luis C.; HEUKELBACH, Jorg; ALENCAR, Carlos H.; ARMSTRONG, Paul K.; ORTIGA-CARVALHO, Tania M.; MENDEZ-OTERO, Rosalia. Zika Virus: what have we learnt since the start of the recent epidemic?. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 1554, p. 1, 22 ago. 2017.
- SAKINAH, S.; PRIYA, Sivan Padma; KUMARI, Sharmilah; AMIRA, Fatin; K., Poorani; ALSAEEDY, Hiba; LING, Mok Pooi; CHEE, Hui-Yee; HIGUCHI, Akon; ALARFAJ, Abdullah A.. Impact of dengue virus (serotype DENV-2) infection on liver of BALB/c mice: a histopathological analysis. **Tissue And Cell**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 86-94, fev. 2017.
- SÁNCHEZ-MONTALVÁ, Adrián; POU, Diana; SULLEIRO, Elena; SALVADOR, Fernando; BOCANEGRA, Cristina; TREVIÑO, Begoña; RANDO, Ariadna; SERRE, Núria; PUMAROLA, Tomàs; ALMIRANTE, Benito. Zika virus dynamics in body fluids and risk of sexual transmission in a non-endemic area. **Tropical Medicine & International Health**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 92-100, 21 dez. 2017.
- SCHAUER, Isaiah G.; RESSLER, Steven J.; TUXHORN, Jennifer A.; DANG, Truong D.; ROWLEY, David R.. Elevated Epithelial Expression of Interleukin-8 Correlates with Myofibroblast Reactive Stroma in Benign Prostatic Hyperplasia. **Urology**, [S.L.], v. 72, n. 1, p. 205-213, 8 mar. 2008.
- SCHON, Hans-Theo; BARTNECK, Matthias; BORKHAM-KAMPHORST, Erawan; NATTERMANN, Jacob; LAMMERS, Twan; TACKE, Frank; WEISKIRCHEN, Ralf. Pharmacological Intervention in Hepatic Stellate Cell Activation and Hepatic Fibrosis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 7, n. 33, p. 1, 24 fev. 2016.
- SEANPONG, Pannatas; SRISAOWAKARN, Chanya; THAMMAPORN, Anothai; LEARDKAMOLKARN, Vijitra; KUMKATE, Supeecha. Different Responses in MMP/TIMP Expression of U937 and HepG2 Cells to Dengue Virus Infection. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 221-229, 20 jan. 2015.

- SEKI, Ekihiro; SCHWABE, Robert F.. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. **Hepatology**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 1066-1079, 28 jan. 2015.
- SHAH, Shailja; MA, Yifei; SCHERZER, Rebecca; HUHNS, Greg; FRENCH, Audrey L.; PLANKEY, Michael; PETERS, Marion G.; GRUNFELD, Carl; TIEN, Phyllis C.. Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. **AIDS**, [S.L.], v. 29, n. 11, p. 1325-1333, 17 jul. 2015.
- SHARMA, Suraj; KHALILI, Korosh; NGUYEN, Geoffrey Christopher. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 20, n. 45, p. 16820, 7 dez. 2014.
- SHERMAN, Kenneth E.; ROUSTER, Susan D.; KONG, Ling X.; ALIOTA, Matthew T.; BLACKARD, Jason T.; DEAN, Gary E.. Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 0214016, 20 mar. 2019.
- SILVA-MORAES, Vanessa; SHOLLENBERGER, Lisa M; SIQUEIRA, Liliane Maria Vidal; CASTRO-BORGES, William; A HARN, Donald; GRENFELL, Rafaella Fortini Queiroz e; RABELLO, Ana Lucia Teles; COELHO, Paulo Marcos Zech. Diagnosis of Schistosoma mansoni infections: what are the choices in brazilian low-endemic areas?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 114, p. 180478, 28 mar. 2019.
- SMITH, Jessica L.; JENG, Sophia; MCWEENEY, Shannon K.; HIRSCH, Alec J.. A MicroRNA Screen Identifies the Wnt Signaling Pathway as a Regulator of the Interferon Response during Flavivirus Infection. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 91, n. 8, p. 16, 15 abr. 2017.
- SINGH, Kasha P.; CRANE, Megan; AUDSLEY, Jennifer; AVIHINGSANON, Anchalee; SASADEUSZ, Joe; LEWIN, Sharon R.. HIV-hepatitis B virus coinfection. **Aids**, [S.L.], v. 31, n. 15, p. 2035-2052, 24 set. 2017.
- SIROHI, Devika; KUHN, Richard J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 216, n. 10, p. 935-944, 15 dez. 2017.
- SLAVOV, S.N.; OTAGUIRI, K.K.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 49, n. 5, p. 5420, 29 abr. 2016.
- SONG, Byung-Hak; YUN, Sang-Im; WOOLLEY, Michael; LEE, Young-Min. Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.L.], v. 308, p. 50-64, 15 jul. 2017.
- SOUSA, Anastácio Q.; CAVALCANTE, Diane I.M.; FRANCO, Luciano M.; ARAËJO, Fernanda M.C.; SOUSA, Emília T.; VALENÇA-JUNIOR, José Telmo; ROLIM, Dionne B.; MELO, Maria E.L.; SINDEAUX, Pedro D.T.; ARAËJO, Marialva T.F.. Postmortem Findings for 7 Neonates with Congenital Zika Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 1164-1167, jul. 2017.
- SOUSA, Jorge R. de; AZEVEDO, Raimunda S.s.; MARTINS FILHO, Arnaldo J.; ARAUJO, Marialva T.F.; MOUTINHO, Ermelinda R.C.; VASCONCELOS, Barbara C. Baldez; CRUZ, Ana C.R.; OLIVEIRA, Consuelo S.; MARTINS, Lívia C.; VASCONCELOS, Beatriz H. Baldez. Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 188, n. 11, p. 2644-2652, nov. 2018.
- SOUZA, Wayner Vieira de; ALBUQUERQUE, Maria de Fátima Pessoa Militão de; VAZQUEZ, Enrique; BEZERRA, Luciana Caroline Albuquerque; MENDES, Antonio da Cruz Gouveia; LYRA, Tereza Maciel; ARAUJO, Thalia Velho Barreto de; OLIVEIRA, André Luiz Sá de; BRAGA, Maria Cynthia; XIMENES, Ricardo Arraes de Alencar.



Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **Bmc Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 5039, 12 jan. 2018.

SPENCER, Jennifer L; LAHON, Anismrita; TRAN, Linda L; ARYA, Ravi P; KNEUBEHL, Alexander R; VOGT, Megan B; XAVIER, Daniela; ROWLEY, David R; KIMATA, Jason T; RICO-HESSE, Rebecca R. Replication of Zika Virus in Human Prostate Cells: a potential source of sexually transmitted virus. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 217, n. 4, p. 538-547, 24 ago. 2017.

STEIN, Eva; CRUZ-LEMINI, Monica; ALTAMIRANO, Jose; NDUGGA, Nambi; COUPER, David; ABRALDES, Juan G.; BATALLER, Ramon. Heavy daily alcohol intake at the population level predicts the weight of alcohol in cirrhosis burden worldwide. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 65, n. 5, p. 998-1005, nov. 2016.

TAM, Clarence C.; O'BRIEN, Sarah J.; PETERSEN, Irene; ISLAM, Amir; HAYWARD, Andrew; RODRIGUES, Laura C.. Guillain-Barré Syndrome and Preceding Infection with Campylobacter, Influenza and Epstein-Barr Virus in the General Practice Research Database. **Plos One**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 344, 4 abr. 2007.

TAPPE, Dennis; PÉREZ-GIRÓN, José Vicente; ZAMMARCHI, Lorenzo; RISSLAND, Jürgen; FERREIRA, Davis F.; JAENISCH, Thomas; GÓMEZ-MEDINA, Sergio; GÜNTHER, Stephan; BARTOLONI, Alessandro; MUÑOZ-FONTELA, César. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 205, n. 3, p. 269-273, 24 dez. 2015.

THEPPARIT, Chutima; PHOOLCHAROEN, Waranyoo; SUKSANPAISAN, Lukkana; SMITH, Duncan R.. Internalization and Propagation of the Dengue Virus in Human Hepatoma (HepG2) Cells. **Intervirolgy**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 78-86, 2004.

TILLU, H.; TRIPATHY, A. S.; RESHMI, P. V.; CECILIA, D.. Altered profile of regulatory T cells and associated cytokines in mild and moderate dengue. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 453-461, 9 fev. 2016.

TOMLINSON, Lauren; HYNDMAN, Lauren; FIRMAN, James W.; BENTLEY, Robert; KYFFIN, Jonathan A.; WEBB, Steven D.; MCGINTY, Sean; SHARMA, Parveen. In vitro Liver Zonation of Primary Rat Hepatocytes. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 7, p. 17, 18 fev. 2019.

TRAUTWEIN, Christian; FRIEDMAN, Scott L.; SCHUPPAN, Detlef; PINZANI, Massimo. Hepatic fibrosis: concept to treatment. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 15-24, abr. 2015.

TRICOT, Tine; HELSEN, Nicky; KAPTEIN, Suzanne J. F.; NEYTS, Johan; VERFAILLIE, Catherine M.. Human stem cell-derived hepatocyte-like cells support Zika virus replication and provide a relevant model to assess the efficacy of potential antivirals. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 0209097, 19 dez. 2018.

TSUCHIDA, Takuma; FRIEDMAN, Scott L.. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 397-411, 10 maio 2017.

TURNER, Mark D.; NEDJAI, Belinda; HURST, Tara; PENNINGTON, Daniel J.. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, [S.L.], v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2 nov. 2014.

SEBASTIÁN, Ugarte Ubiergo; RICARDO, Arenas Villamizar Angel; ALVAREZ, Bruno C.; CUBIDES, Angela; LUNA, Angélica F.; ARROYO-PAREJO, Max; ACUÑA, Cayri E.; QUINTERO, Agamenón V.; VILLAREAL, Orlando Ch.; PINILLOS, Oscar S.. Zika virus-

induced neurological critical illness in Latin America: severe guillain-barre syndrome and encephalitis. **Journal Of Critical Care**, [S.L.], v. 42, p. 275-281, 9 dez. 2017.

WANG, Min-Jun; CHEN, Fei; LAU, Joseph T y; HU, Yi-Ping. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 2805-2805, 18 mai 2017a.

WANG, Wenbiao; LI, Geng; WU, De; LUO, Zhen; PAN, Pan; TIAN, Mingfu; WANG, Yingchong; XIAO, Feng; LI, Aixin; WU, Kailang. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 $\beta$  secretion. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 2645, 9 jan. 2018.

WANG, Yue; HUANG, Xiuzhen; HE, Lingjuan; PU, Wenjuan; LI, Yan; LIU, Qiaozhen; LI, Yi; ZHANG, Libo; YU, Wei; ZHAO, Huan. Genetic tracing of hepatocytes in liver homeostasis, injury, and regeneration. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 292, n. 21, p. 8594-8604, 26 mai. 2017b.

WEAVER, Scott C.; COSTA, Federico; GARCIA-BLANCO, Mariano A.; KO, Albert I.; RIBEIRO, Guilherme S.; SAADE, George; SHI, Pei-Yong; VASILAKIS, Nikos. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 130, p. 69-80, jun. 2016.

WEISKIRCHEN, Ralf; TACKE, Frank. Relevance of Autophagy in Parenchymal and Non-Parenchymal Liver Cells for Health and Disease. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 16, 1 jan. 2019.

WU, Yanhua; CUI, Xiaoyun; WU, Na; SONG, Rui; YANG, Wei; ZHANG, Wei; FAN, Dongying; CHEN, Zhihai; AN, Jing. A unique case of human Zika virus infection in association with severe liver injury and coagulation disorders. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 11393, 12 set. 2017.

WU, Yan-Wei; METTLING, Clément; WU, Shang-Rung; YU, Chia-Yi; PERNG, Guey-Chuen; LIN, Yee-Shin; LIN, Yea-Lih. Autophagy-associated dengue vesicles promote viral transmission avoiding antibody neutralization. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1, 25 ago. 2016.

XIANG, Dai-Min; SUN, Wen; NING, Bei-Fang; ZHOU, Teng-Fei; LI, Xiao-Feng; ZHONG, Wei; CHENG, Zhuo; XIA, Ming-Yang; WANG, Xue; DENG, Xing. The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis. **Gut**, [S.L.], v. 67, n. 9, p. 1704-1715, 28 jul. 2017.

XU, Fengyun; LIU, Changwei; ZHOU, Dandan; ZHANG, Lei. TGF- $\beta$ /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 157-167, 8 jan. 2016.

XU, Fengyun; LIU, Changwei; ZHOU, Dandan; ZHANG, Lei. TGF- $\beta$ /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 157-167, 8 jan. 2016.

YADAV, Pragya D.; KUMAR, Vimal; KUMAR, Sandeep; MOTE, Chandrashekhar S.; MAJUMDAR, Triparna D.; GOKHALE, Mangesh; KORE, Pravin; MOURYA, Devendra T.. Zika virus Pathogenesis in Infant Mice after Natural Transmission by the Bite of Infected Mosquitoes. **Intervirology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 227-234, jul. 2017.

YANG, Libang; HERRERA, Jeremy; GILBERTSEN, Adam; XIA, Hong; SMITH, Karen; BENYUMOV, Alexey; BITTERMAN, Peter B.; HENKE, Craig A.. IL-8 mediates idiopathic pulmonary fibrosis mesenchymal progenitor cell fibrogenicity. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [S.L.], v. 314, n. 1, p. 127-136, 1 jan. 2018.

- YANG, Xue; LIANG, Lei; ZONG, Chen; LAI, Fobao; ZHU, Pengxi; LIU, Yu; JIANG, Jinghua; YANG, Yang; GAO, Lu; YE, Fei. Kupffer cells-dependent inflammation in the injured liver increases recruitment of mesenchymal stem cells in aging mice. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 1084-1095, 23 dez. 2015.
- YOON, Young; LEE, Youngmin; FRIEDMAN, Scott. Antifibrotic Therapies: where are we now?. **Seminars In Liver Disease**, [S.L.], v. 36, n. 01, p. 087-098, 12 fev. 2016.
- YOUNOSSI, Zobair M.; KOENIG, Aaron B.; ABDELATIF, Dinan; FAZEL, Yousef; HENRY, Linda; WYMER, Mark. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease- Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 73-84, 22 fev. 2016.
- YU, Yao; CAI, Jingjing; SHE, Zhigang; LI, Hongliang. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. **Advanced Science**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1801585, 12 dez. 2018.
- ZIMMERMANN, Henning W.; SEIDLER, Sebastian; GASSLER, Nikolaus; NATTERMANN, Jacob; LUEDDE, Tom; TRAUTWEIN, Christian; TACKE, Frank. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 21381, 22 jun. 2011.
- ZHANG, Yue; GAO, Wei; LI, Jian; WU, Weihua; JIU, Yaming. The Role of Host Cytoskeleton in Flavivirus Infection. **Virologica Sinica**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 30-41, fev. 2019.
- ZHANG, Zhenzhen; RONG, Liang; LI, Yi-Ping. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: implications for viral pathogenesis. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2019, p. 1-17, 19 ago. 2019.
- ZHANG, Zongyi; SUN, Menghan; DENG, Jieping; YU, Jianhai; YANG, Xuesong; ZHAO, Wei; CHEN, Guobing; WANG, Pengcheng. Zika Virus Induced More Severe Inflammatory Response Than Dengue Virus in Chicken Embryonic Livers. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1127, 22 maio 2019.
- ZOUBEK, Miguel Eugenio; TRAUTWEIN, Christian; STRNAD, Pavel. Reversal of liver fibrosis: from fiction to reality. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 129-141, abr. 2017.

1 **APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA “PLOS NEGLECTED**  
2 **TROPICAL DISEASES”**

3  
4 Zika virus infects hepatocytes and hepatic stellate cells and inhibits liver repair  
5 process

6  
7 Jessica Paula Lucena<sup>1\*¶#a</sup>, Lindomar José Pena<sup>2&</sup>, Danielle Maria Nascimento Moura<sup>1&</sup>,  
8 Sheilla Andrade de Oliveira<sup>1&</sup>

9  
10 <sup>1</sup> Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation - Aggeu Magalhães Institute,  
11 Recife, Pernambuco, Brazil.

12 <sup>2</sup> Department of Virology and Experimental Therapy, Oswaldo Cruz Foundation - Aggeu  
13 Magalhães Institute, Recife, Pernambuco, Brazil.

14 <sup>#a</sup> Current address: Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation - Aggeu  
15 Magalhães Institute, Recife, Pernambuco, Brazil.

16 \*Corresponding author: [jesspluc@gmail.com](mailto:jesspluc@gmail.com)

17  
18 ¶ These authors contributed equally to this work.

19 & These authors contributed equally to this work.

## 21 **Abstract**

22

23 Chronic liver diseases are a serious public health problem worldwide, caused by several  
24 etiologies, which have in common hepatocellular necrosis and the development of liver  
25 fibrosis. It is characterized by excessive deposition of scar extracellular matrix in sites of  
26 injury, mainly by hepatic stellate cells. Because they are morbidities with worldwide  
27 prevalence, chronic liver diseases are underlying diseases in patients with various clinical  
28 conditions. During the epidemics of arboviruses, cases of flavivirus infection with hepatic  
29 impairment were described. The Zika virus (ZIKV) belongs to the genus flavivirus, as does  
30 the Yellow Fever and Dengue virus. Although first described in 1952, it has become a major  
31 public health problem in the past years due to its association with microcephaly and Guillain-  
32 Barré Syndrome. Questions regarding pathogenesis and possible synergistic effects on  
33 comorbidities need to be clarified. We infected Hepatocytes (HepG2 cell line) and Hepatic  
34 Stellate Cells (LX-2 and GRX cell lines) and evaluated that they support infection. The  
35 infection was confirmed through the ZDC Molecular Kit and virus titers were quantified by  
36 TCID50 plaque assay. No cytopathic effect was observed in these strains when compared to  
37 the Vero lineage. We determined expression changes in genes involved in liver repair process  
38 (Smooth Muscle  $\alpha$ -actin, TGF- $\beta$ , Galectin 3 and Collagen I) [qPCR and electron microscopy  
39 results]

40

41 Keywords: Zika virus infection, Liver fibrosis, Hepatic stellate cells, In Vitro techniques,  
42 Cytopathogenic effect, viral.

43

44

45

## 46 **Author Summary**

47

48 In the past few years, Zika virus re-emerged as a public health emergency. During its epidemic  
49 in Brazil, it was related an increased number of microcephaly and birth defects, especially in  
50 northeastern region of the country. Despite been described since the 50s, its association to  
51 chronic diseases are still a uncertain matter. Some studies describe liver impairment during  
52 the disease, suggesting a possible synergistic effect on established liver diseases. In this in  
53 vitro study, we observed that liver cells involved in the repair process, such as hepatocytes  
54 and hepatic stellate cells support ZIKV infection. Furthermore, genes involved in fibrogenesis  
55 (e.g.  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, Galectin-3, TGF- $\beta$ 1, Collagen IV) were superexpressed after  
56 ZIKV infection.

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

## 68 **Introduction**

69

70           Given its multiple roles in homeostasis maintenance, mainly due to detoxification -  
71 when xenobiotics are metabolized, liver cells are susceptible to damage constantly [1].  
72 Among chronic liver diseases, viral hepatitis, abusive use of alcohol and/or drugs and NASH  
73 are the most common. Hepatic cirrhosis is responsible for over a hundred deaths in Europe  
74 per year and it is the main cause of transplant [2-5]. Despite its major health problem status,  
75 liver diseases are still considered neglected.

76           Chronic liver diseases are characterized by continuous damage stimuli, leading to a  
77 repair response and fibrogenesis [6-8]. During liver damage, hepatocytes are the main  
78 affected cell population, due to its exchange of metabolites in the sinusoids. Cell death leads  
79 to an inflammatory microenvironment, containing cytokines such as TGF- $\beta$ 1 and PDGF,  
80 which works as a profibrogenic stimulus to hepatic stellate cells (HSCs) [9-11]. This type of  
81 cell plays the main role in fibrogenesis, as the major source of ECM components [12-14].

82           Hepatic fibrosis is determinant in chronic liver disease development. During viral  
83 infection-related fibrogenesis, ROS and some non-structural proteins (e.g. NS3 and NS5) are  
84 described as the main scarring stimuli [15]. It has been observed that *Flavivirus* infection  
85 (such as YFV, DENV and ZIKV) can have a synergistic role in liver impairment in patients  
86 with established hepatic diseases [16-18]. Given the coprevalence areas and common  
87 transmission routes (as HBV and HCV, ZIKV can be transmitted sexually and vertically),  
88 coinfection cases are a possibility.

89           Zika virus is an arbovirus with an enveloped single-stranded positive-sense RNA  
90 genome. Similar to Dengue fever, its symptoms include headache, arthralgia, fever, fatigue  
91 and cutaneous rash in most cases [19,20]. It is considered a neglected tropical disease since its

92 discovery in 1952, with sporadic reported cases in Africa and Asia, until 2007 with local  
93 epidemics in the Pacific Islands [21-25]. It emerged as a public health problem in 2015,  
94 during the global epidemic, with reported cases in Asia, USA and Latin America. The World  
95 Health Organization declared ZIKV as a Global Health Emergency in 2016, due to its  
96 association to microcephaly and birth defects in newborns and Guillain-Barré development in  
97 adults [26-28].

98 Case report studies have observed liver cells necrosis, edema and esteatosis in post  
99 mortem analysis of ZIKV affected patients [29]. In vitro studies observed that ZIKV can  
100 infect and constantly replicate in some cell lineages, suggesting potential viral reservoirs in  
101 the human body [30-32]. Furthermore, the mechanisms of ZIKV in liver function impairment  
102 is a field still poorly understood.

103 Therefore, in this study we evaluated the impact of ZIKV replication in hepatocytes  
104 and HSCs, and its consequences in the liver repair process, assessing cell viability  
105 implications and fibrogenesis related-factors expression.

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115



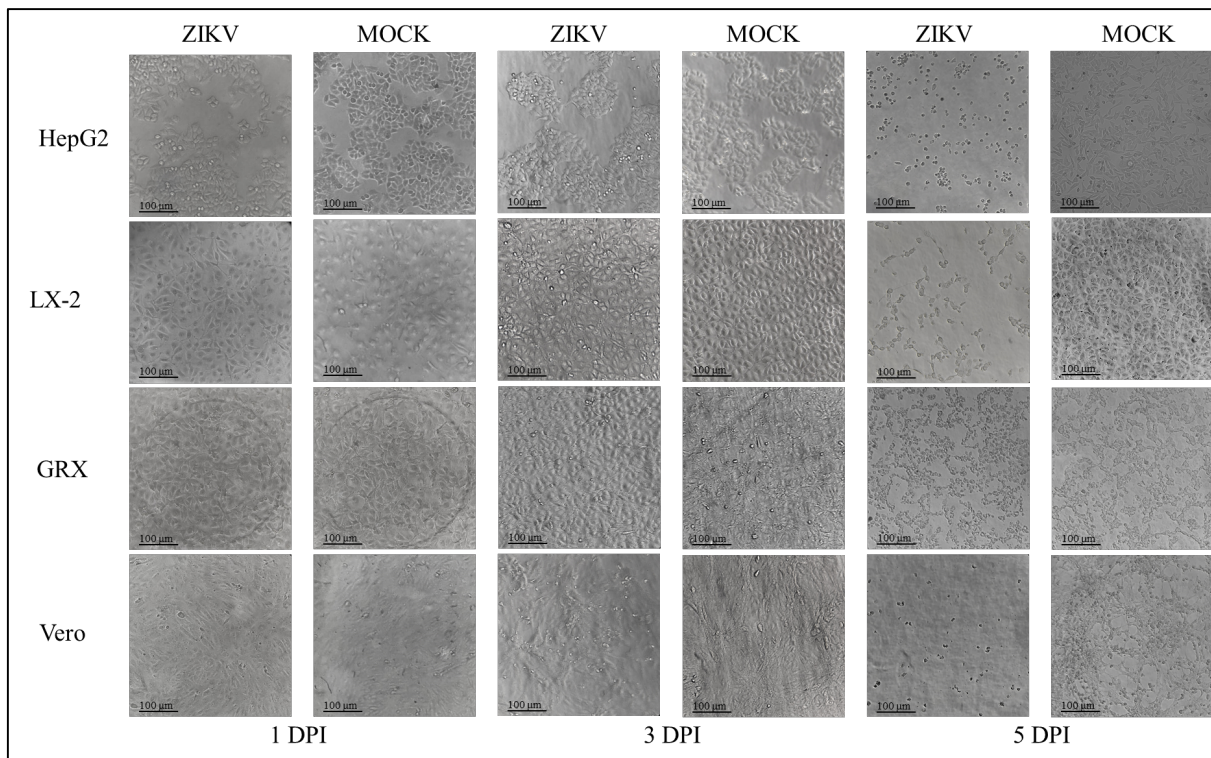
116 **Results**

117

118 **HepG2, LX-2 and GRX cells are permissible to ZIKV infection**

119 Hepatocytes and HSCs were infected with ZIKV at 0.1 MOI, followed by viral replication  
 120 monitoring until 5 days post-infection (dpi). All evaluated cell lines have shown  
 121 permissibility to infection. Vero cells have shown rounding and individualization, until 5 dpi,  
 122 when it presented a more aggressive cytopathic effect (CPE), with cell detachment from the  
 123 plate surface. Unlike Vero cells, that presented CPE starting from 3 dpi, HepG2 and LX-2  
 124 cells demonstrate CPE after 5 dpi (Fig 1). It was observed detached cells and  
 125 individualization. GRX cells didn't shown CPE in any of the intervals.

126 **Fig 1. Cell lines infected by ZIKV and controls (MOCK) within 1, 3 and 5 days-post**  
 127 **infection.** Cells were photographed with a camera through an inverted microscope.



128

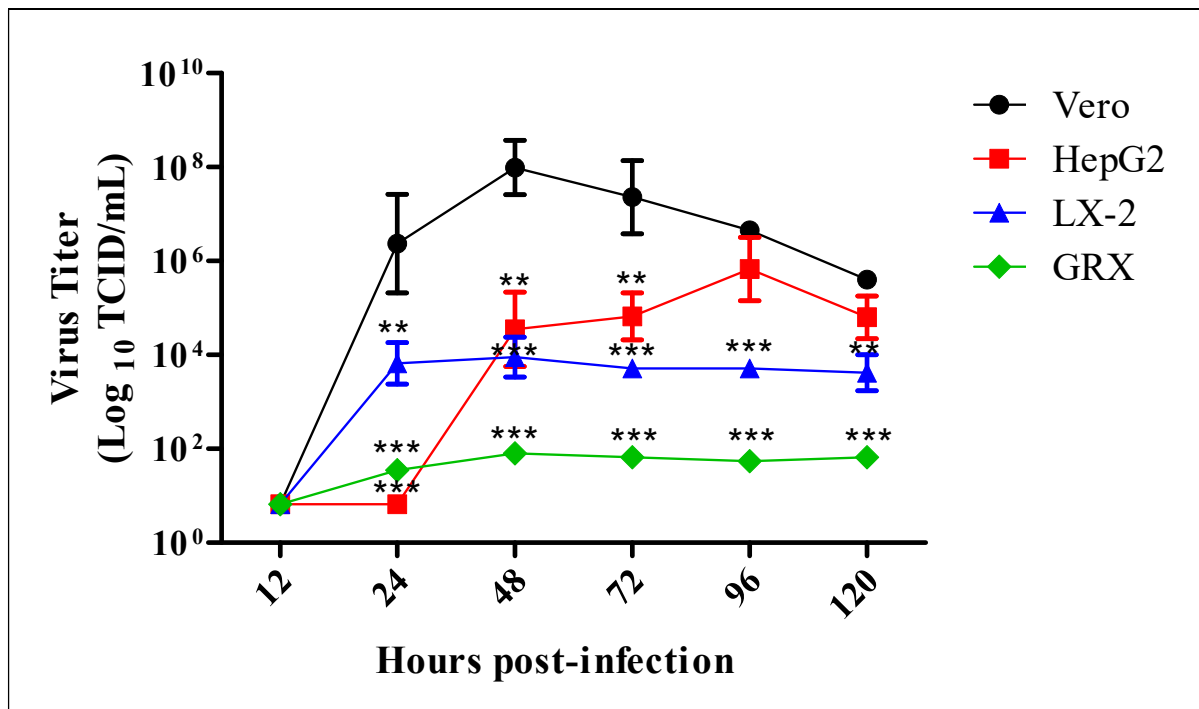
129

130 Supernatants virus titers were quantified by TCID<sub>50</sub> assay (Fig 2). Vero cells were used for  
 131 comparison. In the first analyzed gap (12 hours post-infection), there was no quantifiable

132 virus titer, probably due to the viral eclipse, the period it takes to a virus to penetrate the cell  
 133 membrane and initiate virions synthesis. The hepatocyte cell line presented a rising number of  
 134 virions starting from 2 dpi and reached a peak of  $5.8 \times 10^6$  TCID50/mL on 4 dpi, when it  
 135 were as effective as Vero cells. Regarding human HSCs (GRX and LX-2 cells), there was no  
 136 peak. The quantified progeny viruses were the same throughout the evaluated periods, with  
 137  $3.4 \times 10^4$  TCID50/mL for LX-2 and  $1,7 \times 10^2$  TCID50/mL for GRX, starting from 1 until 5  
 138 dpi.

139

140 **Fig 2. Viral growth curve.** Data regarding the production of infectious viral particles in the  
 141 studied cell lines. TCID50/mL: Infective dose in 50% of tissue culture/milliliter. Asterisks  
 142 denote statistically significant data in relation to the control cell line VERO in each specific  
 143 interval (\*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ). Graphs were produced using GraphPad  
 144 Prism Version 5.1.



145

146

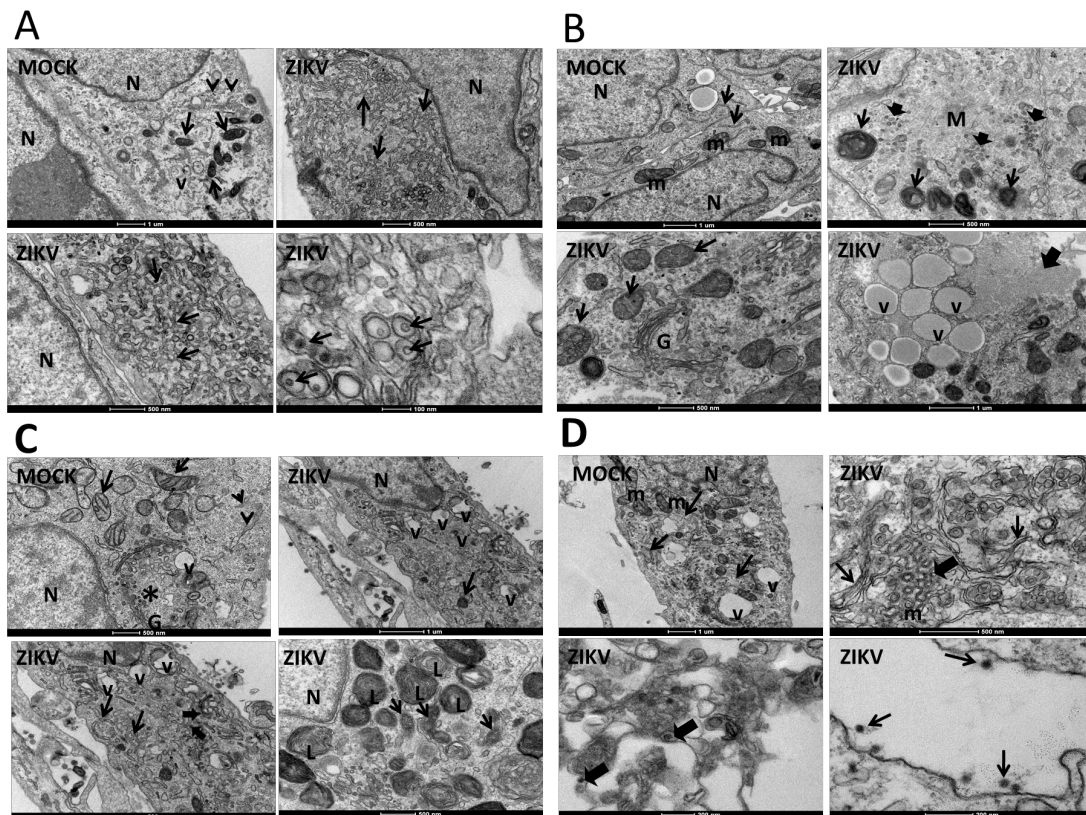
147 Infected cells were analyzed after 72 hours post infection by transmission electron

148 microscopy (Fig 3). It was visualized that most lineages have showed hypertrophy in

149 endoplasmatic reticulum associated with vesicular bodies and vacuolization. Also was

150 observed that microtubule was rearranged next to viral particles. HepG2 cells' mitochondria  
 151 presented internal vesicular bodies. LX-2 cells presented glycogen accumulation. Viral  
 152 particles were also seen in GRX controls, indicating that this lineage was preinfected with  
 153 other type of virus.

154 **Fig 3. Transmission electron microscopy of ZIKV-infected cells and controls (MOCK)**  
 155 **within 3 days-post infection.** (A) Vero cells, presenting nucleus (N), mitochondria (black  
 156 arrows) and endoplasmatic reticulum (black arrow heads) in MOCK and hypertrophy in  
 157 endoplasmatic reticulum associated with viral particles (black arrows) in ZIKV group. (B)  
 158 HepG2 cells presenting nucleus (N), mitochondria (m) and endoplasmatic reticulum (black  
 159 arrows) in MOCK. And in ZIKV group, autophagossomes (black arrows), amorphous  
 160 material accumulation, possibly glycogen (M). (C) GRX cells presenting nucleus (N),  
 161 mitochondria (black arrows) and viral particles (\*) in control group (MOCK). ZIKV-infected  
 162 cells presented dilated endoplasmatic reticulum (black arrows), vacuolization (v),  
 163 mitochondria with crest loss (arrows) and lamellar bodies (L). (D) LX-2 cells presenting  
 164 nucleus (N), mitochondria (m), vacuoles (v) and endoplasmatic reticulum (black arrows) in  
 165 MOCK cells. In ZIKV group, its observed hypertrophy in endoplasmatic reticulum containing  
 166 viral particles (black arrows) and microtubule matrix associated to vesicles (large arrows).



167

168

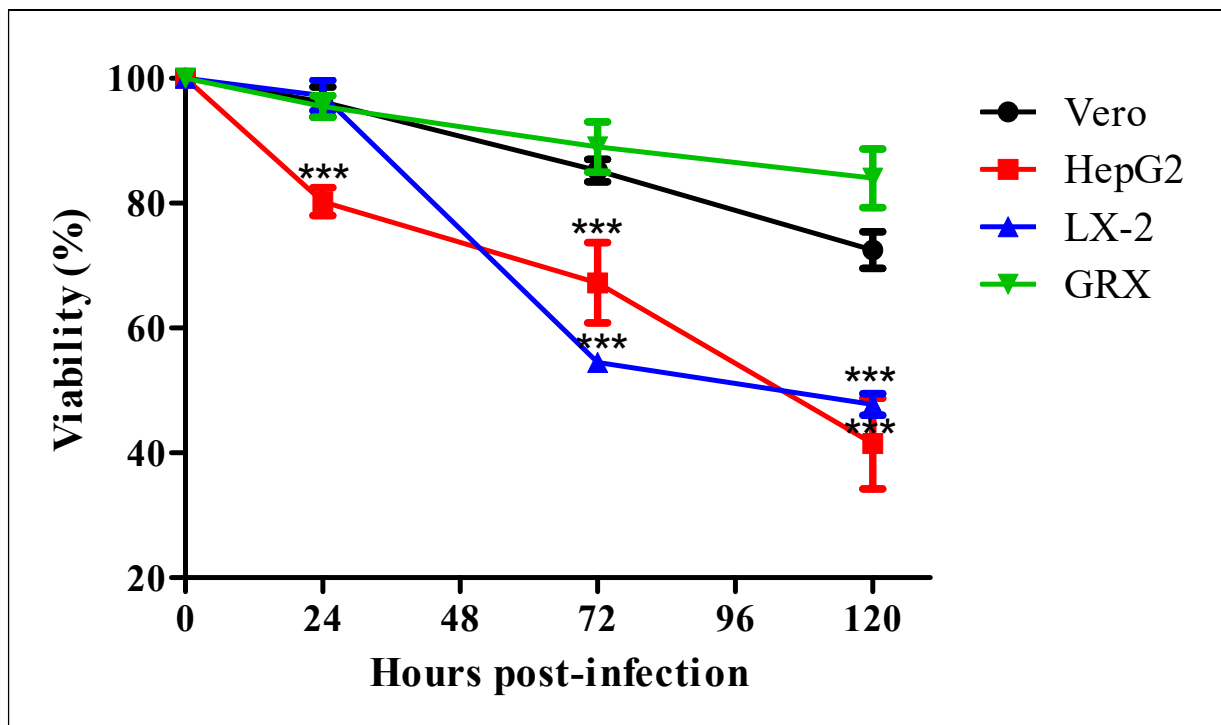
169

170 **ZIKV infection disrupts cells mechanisms**

171 Cell survival was assessed by XTT technique (Fig 4), in which XTT compound is  
 172 converted in soluble formazan crystals by viable cells, which leads to color change. It was  
 173 observed that only HepG2 cells presented a decrease in viability after 24 hours (to 80%). In  
 174 72 hour gap, HepG2 and LX-2 cells demonstrate intense decrease in survival (to 66 and 54%,  
 175 respectively). In 120 hour interval, a similar pattern was observed: HepG2 and LX-2 cells  
 176 decrease to 41 and 47% survival. Meanwhile, GRX have showed a mild decrease, with 82%  
 177 survival. Interestingly, Vero cells' viability doesn't drop as much as was expected, showing  
 178 80% of survival. This is probably due to biased assessment of XTT, that is unable to evaluate  
 179 viability with accuracy in confluent cells.

180

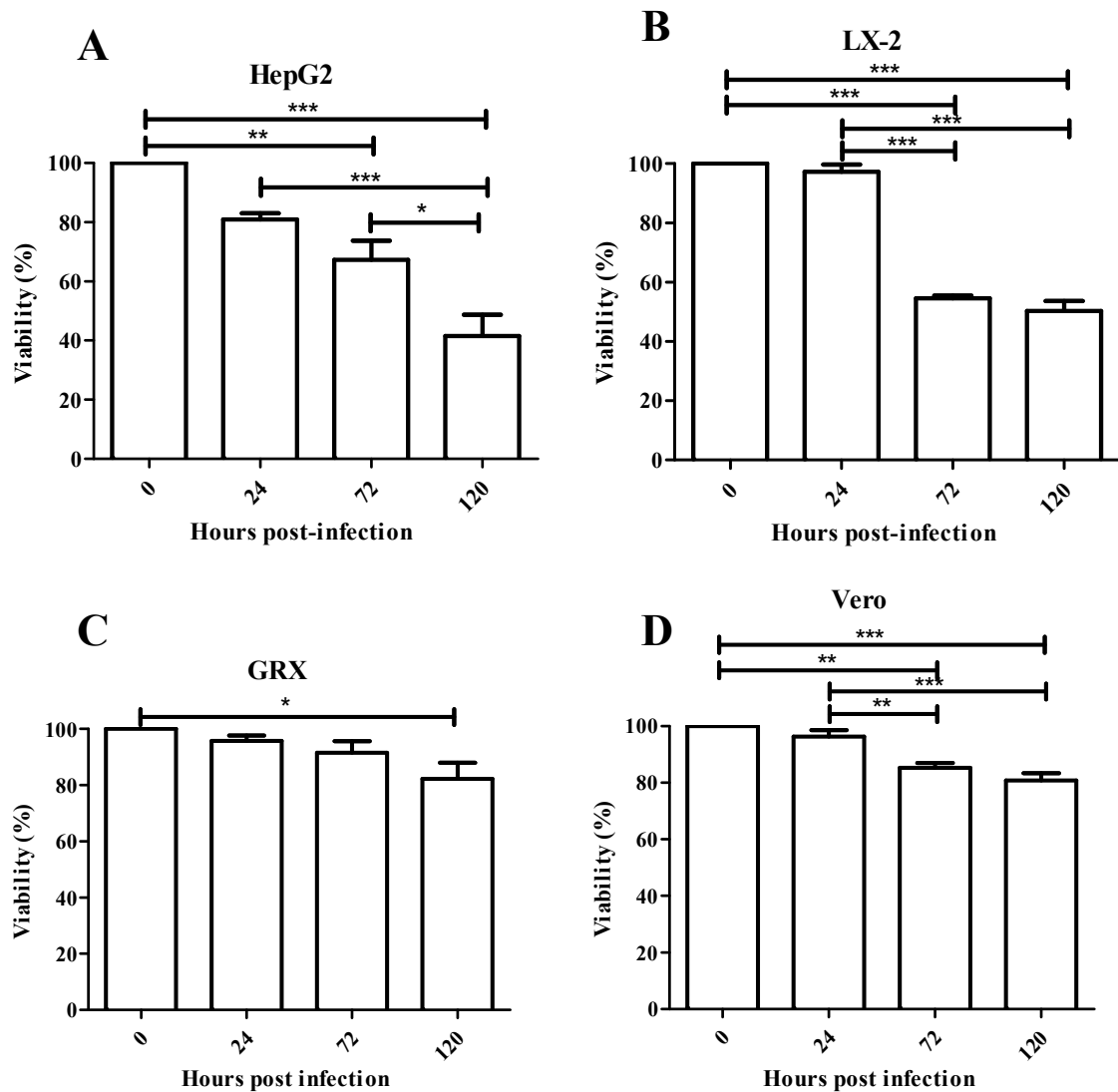
181 **Fig 4. Cell viability after ZIKV infection in Vero, HepG2, LX-2 and GRX cells.** It was  
 182 observed that during this experiment, HepG2 and LX-2 cells were the most damaged, with  
 183 less than 50% survival, in comparison to GRX and Vero cells.



184  
 185

186 Furthermore, the data was analyzed by cell lineage point of view. HepG2, LX-2 and  
 187 Vero cells presented decrease starting from 72h gap (Fig. 5 A, B and D, respectively); and  
 188 that LX-2 showed abrupt impairment. Meanwhile, GRX cell line presents a belated response,  
 189 with survival decrease only after 120 hours (Fig 5 C).

190 **Fig 5. Cell viability by cell lineage.** Data regarding the survival of the studied cell lines after  
 191 ZIKV infection. Asterisks denote statistically significant data in relation to other columns  
 192 (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ ). Graph produced using GraphPad Prism Version  
 193 5.1



194

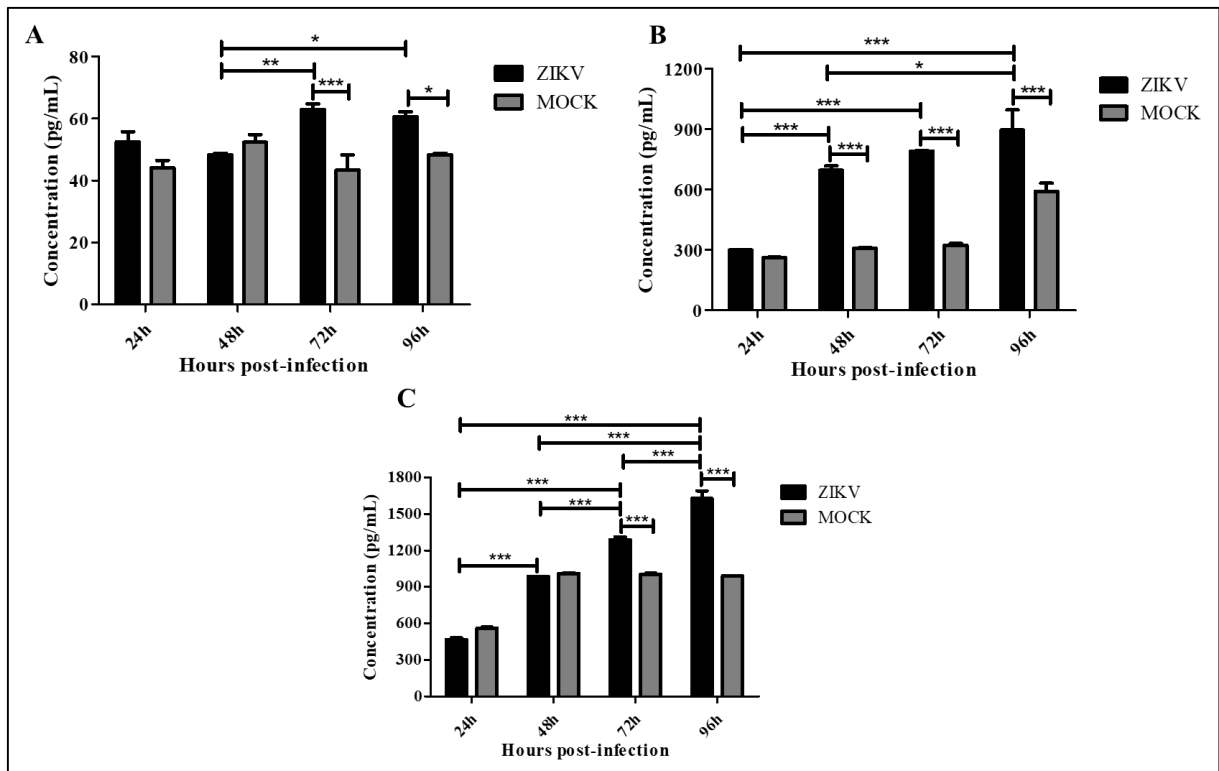
### 195 **ZIKV infection alters immunomodulation routes in the liver repair process**

196 The concentration of profibrogenic and proinflammatory cytokines on infected cells  
 197 supernatants were analyzed by immunologic assays, such as ELISA and CBA. We observed  
 198 that the ZIKV-infection led to increased production of TGF- $\beta$ 1, a profibrogenic cytokine  
 199 involved in HSCs activation, in all cell lineages on the evaluated periods (Fig 6). HSCs  
 200 lineages (GRX and LX-2) presented an early response, with significant increase after 48

201 hours. TGF- $\beta$ 1 production was higher in GRX cells, that produce an average of 1679 pg/ml  
 202 after 72 hours of infection (Fig 6C). LX-2 cells produce an average of 979 pg/ml after same  
 203 interval (Fig 6B). HepG2 response was late (only after 72 hours) and slight in comparison  
 204 (Fig 6A).

205

206 **Fig 6. TGF- $\beta$ 1 concentrations after ZIKV infection in and hepatocytes (A) and HSCs (B**  
 207 **and C).** TGF- $\beta$ 1 concentrations in pg/mL in the intervals of 24h, 48h, 72h and 96h. Increased  
 208 production of TGF- $\beta$ 1 was observed in all lineages after ZIKV infection. Graph were  
 209 produced using GraphPad Prism Version 5.1.



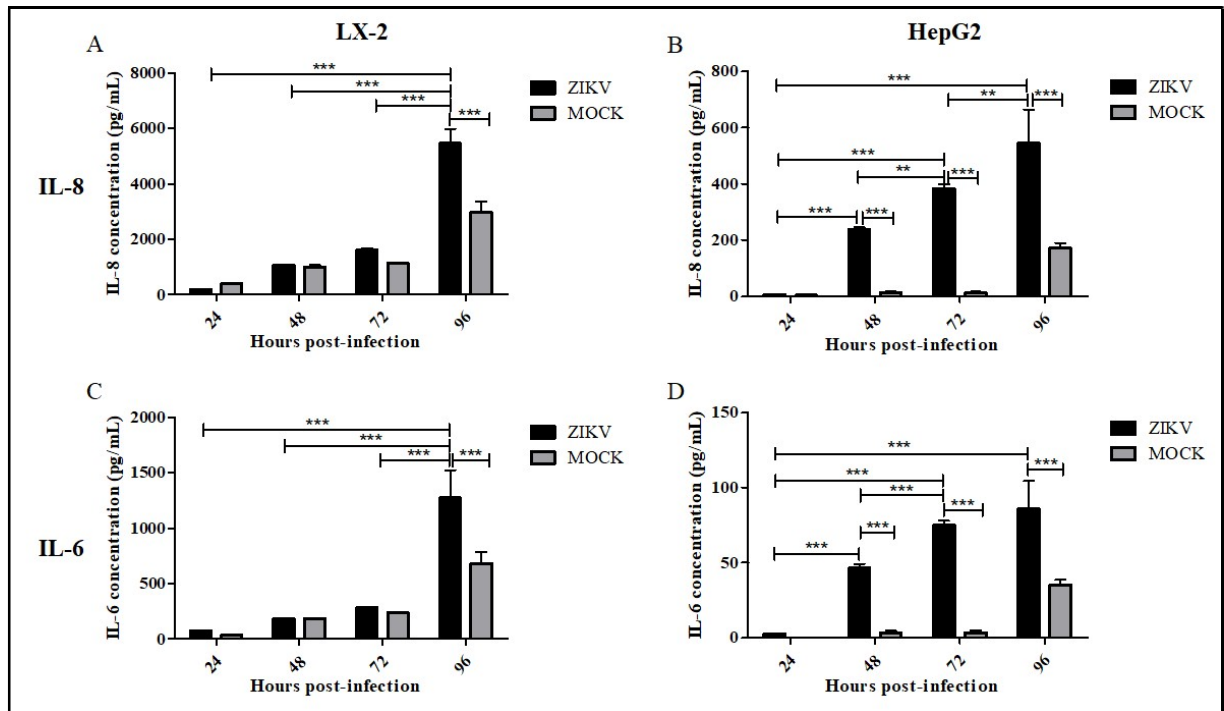
210

211

212 Regarding proinflammatory cytokines, it was observed that human HSCs have increased its  
 213 production of IL-6 and IL-8 after ZIKV infection, starting from 4 dpi (Fig 4). Hepatocytes  
 214 presented a more early and progressive response, starting from 2 dpi. However, HSCs  
 215 produced these cytokines about 10 times more than human hepatocytes, suggesting a robust,  
 216 but late response after viral infection.

217

218 **Fig 4. Proinflammatory cytokines increased production after ZIKV infection.** IL-8  
 219 production has raised 4 days after ZIKV infection in human HSCs (A), and in 2 days in  
 220 hepatocytes (B). Also, IL-6 production shown a similar pattern in HSCs (C) and hepatocytes  
 221 (D). Graph produced using GraphPad Prism Version 5.1. Cytokines concentrations in pg/mL  
 222 in the intervals of 24h, 48h, 72h and 96h.



223

224

## 225 Discussion

226 ZIKV arised as an important health issue after 2015 global epidemic. Despite been  
 227 described since 1952, studies regarding liver tropism and possible synergistic effects related  
 228 to stablished diseases are sparse. In vitro studies have evidenced viral RNA detection in  
 229 immunodepressed mice and monkeys after experimental ZIKV infection [33-34]. Severe liver  
 230 inflammation (similar aspects to hepatitis) in chicken embryos and immunodepressed mice  
 231 [35].

232 In this study, ZIKV replication and its impacts on hepatocytes and HSCs were  
 233 evaluated. Hepatic cells have shown to be permissive to infection with the circulating strain in  
 234 Pernambuco. Hepatocytes cell line analyzed in this study was capable to produce virus titers  
 235 as much as Vero cells, routinely used in lab techniques. This found also demonstrate a  
 236 biotechnological potential to this lineage. Sherman and colleagues have done HepG2 infection  
 237 by ZIKV and described high viral titers after 24 hours of infection [36]. We also observed that  
 238 HepG2 viability dropped to less than 50% after 120 hours post infection, agreeing to CPE

239 data. Besides, we demonstrated that TGF- $\beta$ 1, IL-6 and IL-8 production was increased,  
240 meaning that ZIKV can impair the hepatic repair process.

241 This is the first paper to describe ZIKV infection in HSCs. It was observed that,  
242 despite been able to produce less virus titers than others, HSCs were persistent infected  
243 without presenting any CPE. This suggests a possible viral reservoir in human body. Viability  
244 assay data also showed that GRX cell was the less damaged after 120 hours, meaning that this  
245 cell line is permissive to ZIKV infection (and coinfection, thus is already infected by  
246 retrovirus) and resistant to injury.

247 Ultrastructural analysis denoted that HepG2, LX-2 and GRX cell lines suffer  
248 morphological changes such as hypertrophy of endoplasmic reticulum and microtubuli  
249 rearrangement, as does Vero cells. ZIKV particles have 50 nm diameter and its entry in host  
250 cells is clathrin-dependent. After an invagination process, replication factories bud to ER-  
251 membrane and lead to mitochondrial an ER stress, associated to autophagosomes and  
252 exosomes induction [37]. It is described that ZIKV replication is directly dependent of  
253 cytoskeleton rearrange [38]. Besides, similar ultrastructural changes were described to DENV  
254 infection [39].

255 ROS accumulation is described as one of the firsts stimuli to HSCs activation to a  
256 myofibroblast-like profile [40]. ER and mitochondria stress leads to high production of ROS.  
257 Also, flavivirus infection stimulates NOx expression, a complex associated to ROS  
258 production in mitochondria [41]. It was observed that ZIKV infection is associated to  
259 impairment in SOD and CAT, antioxidative enzymes, in HepG2 cells and in mice livers after  
260 infection [42].

261 Besides characterize infection, this study's focus was to evaluate changes in fibrosis-  
262 related factors expression and production. Regarding that, it was observed that IL-6 and IL-8  
263 proinflammatory cytokines were more produced by human hepatocytes and HSCs after ZIKV  
264 infection. Interestingly, similar profiles were founded in DENV patients, associating the  
265 elevation in these cytokines to more severe outcomes, such as hemorrhagic dengue and  
266 neurological symptoms [43,44].

267 TGF- $\beta$ 1 cytokine is considered the major stimuli of HSCs and hepatic fibrogenesis.  
268 During DENV infection, high levels of TGF- $\beta$ 1 were founded in dengue fever patients [45-  
269 47]. As for ZIKV, Sousa and colleagues have described that brain tissue samples of  
270 microcephaly fatal cases showed higher levels of TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-10 [48].  
271 IL-6 and IL-8 is also described in inflammatory microenvironment of liver repair process [49-  
272 51]. A profibrogenic potential was also described for IL-8 in hepatic fibrogenesis [52].



273 Besides, IL-8 response to flavivirus was also observed with DENV infection [53,54]. IL-6  
274 was found in higher levels in sera samples of patients with chronic hepatic liver disease HCV-  
275 related [55].

276 Findings described in this work corroborates cellular responses profiles observed in  
277 other flaviviruses infection, such as DENV. Besides brings new data related to ZIKV  
278 infection in hepatic cells, in special in HSC population and its influence on cytokines  
279 involved in liver repair and wound healing process.

280

## 281 **Conclusions**

282

283 Based in these findings, we can conclude that ZIKV is able to infect HepG2, LX-2 and  
284 GRX cells *in vitro*. Furthermore, ZIKV results in morphological changes in an ultrastructural  
285 level, related to cellular stress in response to viral infection. Moreover, ZIKV infection leads  
286 to increased production of profibrogenic and proinflammatory cytokines involved in  
287 fibrogenesis, indicating that ZIKV has potential to cause disbalance in pre-established  
288 pathological processes in patients with liver diseases.

289

## 290 **Methods**

291

### 292 **Cells**

293 In this study, we used Immortal human hepatocytes (HepG2 cell line), derived from human  
294 primary hepatoblastoma, provided by Dr. Valéria Pereira, from the Immunology Department  
295 Oswaldo Cruz Foundation - Aggeu Magalhães Institute. GRX cell line, immortal HSCs

296 isolated from murine schistossomotic granulomas, was purchased from Rio de Janeiro Cell  
297 Bank (BCRJ 0094). LX-2 cell line, immortal HSCs isolated by spontaneous migration from  
298 human liver, was given by Dr. Scott Friedman, from Icahn School of Medicine at Mount  
299 Sinai. Vero cell line was provided by the Department of Virology and Experimental Therapy,  
300 Oswaldo Cruz Foundation - Aggeu Magalhães Institute. Cells were maintained in DMEM  
301 media, supplemented with 10%FBS, 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA), at 37°C in  
302 5% CO<sub>2</sub>. Cells were passaged every 3-4 days, with Trypsin 0,2%/EDTA 0,02% solution.

303

#### 304 **Virus stock**

305 The ZIKV viral stock used in this study (ZIKV/H. Sapiens/Brazil/PE243/2015) was provided  
306 by the Department of Virology and Experimental Therapy, Oswaldo Cruz Foundation -  
307 Aggeu Magalhães Institute. This virus strain was isolated from a patient with exantematic  
308 disease from Pernambuco, Brazil (GenBank sequence: KX197192.1). This viral stock was  
309 amplified by growth in Vero Cells culture and preserved in 2%FBS DMEM at -80°C. Its titers  
310 were quantified by TCID<sub>50</sub> assay in Vero cells.

311

#### 312 **Virus inoculation**

313 Cells were grown at 70-80% confluency and infected at 0.1 MOI. The inoculum was adsorbed  
314 in cell culture surface by shaking culture plates every 15 minutes during 1 hour, followed by 2  
315 washes with sterile PBS and adding fresh culture media supplemented with 2% FBS.  
316 Cells were maintained at 37°C, in a CO<sub>2</sub> incubator for predetermined periods.

317

#### 318 **Photomicrography**

319 ZIKV-infected and MOCK (negative controls) cells were observed in 1, 3 and 5 days post-  
320 infection at Nikon TE-2000 inverted microscope, to evaluate possible cytopathic effects  
321 (CPE). Photographs were taken in 200x magnification in a coupled camera.

322

### 323 **Evaluation of viral replication**

324 In order to evaluate ZIKV replication in the target cell lines, we performed 2 methods: end-  
325 point dilution titer by plaque assay and quantitation by real-time PCR.

326

### 327 **TCID50 Assay**

328 Supernatant samples were collected at 12-, 24-, 48-, 72-, 96- and 120-hours post-infection.  
329 This samples were serially diluted 7-fold in DMEM. Then 50  $\mu$ L were added in Vero cells  
330 monolayers, in quadruplicate, using 96-wells cell plates (Corning, USA). The inoculum was  
331 adsorbed for 1 hour, followed by adding 150  $\mu$ L of fresh medium. Plates were incubated for 4  
332 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then examined to observe CPE in Nikon TE-2000  
333 inverted microscope. Positive wells (presenting CPE) were counted. Data was plotted in  
334 Reed-Muench datasheets, using Microsoft Office Excel. All experiments were performed in  
335 triplicates.

336

### 337 **Viral load quantification**

338 Cells were harvested at 24-, 48-, 72-, 96- and 120-hours post-infection, using Trypsin  
339 0,2%/EDTA 0,02% solution. Then washed with sterile PBS and suspended in Trizol  
340 (Invitrogen, USA) and chloroform. After centrifugation, the superficial translucent phase were  
341 carefully collected in order to isolate total RNA. After precipitation in isopropanol and

342 washes with ethanol 70% (vol/vol), samples were suspended in DEPC-water. RNA was  
343 quantified in NanoDrop D-1000 and then, aliquots containing 1,5 µg were used in a RT-PCR  
344 assay, with ZDC Molecular Kit (BioManguinhos, Brazil), according to manufacturer's  
345 recommendations. Samples presenting Cts lower than 38 were considered negative.

346

#### 347 **Cell viability assessment**

348 Cells were infected at 0.1, 0.5, 1 and 5 MOI as described above. Cells were washed with  
349 sterile PBS after 1-, 3- and 5-days post-infection. Then cell viability was evaluated using XTT  
350 assay kit (ThermoFisher, USA), according to manufacturer's protocols. Cells were incubated  
351 with XTT diluted in phenol-free media (final concentration: 0,3 mg/ml) for 4 hours, followed  
352 by adding of DMSO. Colorimetric changes were quantified by spectrophotometer plate reader  
353 (ThermoFisher, USA), at 600 nm, with 570 nm correction. The percentage of survival was  
354 calculated using the formula:  $(ABS_{infected}/ABS_{uninfected}) \times 100$ .

355

#### 356 **Cytokines quantification**

357 In order to quantify possible changes in the production of cytokines involved in fibrogenesis  
358 process due to ZIKV infection, we performed immunological assays. Supernatant samples  
359 were collected at 24-, 48-, 72- and 96- hours post-infection. Human IL-6 and IL-8 present in  
360 HepG2 and LX-2 supernatants were quantified using CBA Human Inflammatory Kit (BD  
361 Biosciences), following manufacturer's protocols. Samples were analyzed in FACScalibur  
362 flow cytometer. IL-6 and IL-8 present in GRX supernatant were quantified using sandwich  
363 ELISA assay. TGF-β1 were quantified using Human/Mouse ELISA kit (eBioscience, USA).  
364 Colorimetric changes were quantified by spectrophotometer plate reader (ThermoFisher,  
365 USA), at 570 nm.

366

**367 Electron microscopy**

368 In order to evaluate and compare post-infection effects in the target cell lines in a  
369 ultrastructural level, we performed transmission (TEM).

**370 TEM**

371 Cells were grown in T25 culture bottles and infected in 0.1 MOI as described above and  
372 harvest at day 3 post-infection. ZIKV-infected and MOCK cells were washed with sterile  
373 PBS, followed by incubation with 2.5% glutaraldehyde/sodium cacodylate buffer fixative for  
374 1 hour. Following fixation, samples were maintained in 1% osmium tetroxide and 1,6%  
375 potassium ferrocyanide in post-fixative buffer for 1 hour. Cells were submitted to a  
376 dehydration process in serial acetone baths. Samples were infiltrated in EPON 812 and  
377 maintained in an incubator at 60°C. Sections (60-70 nm) were contrasted with uranyl acetate  
378 and examined in JEOL 100CXII transmission electron microscope.

379

**380 Statistical analysis**

381 Data were expressed in medium values and submitted to a normality test (Shapiro-Wilk).  
382 Given the p-value, parametric (one-way ANOVA) and non-parametric (Kruskal-Wallis,  
383 Dunn's post-hoc) tests were executed as needed. The viral curve growth data was first  
384 submitted to a two-way ANOVA, in order to evaluate interactions between 'time' and 'cell  
385 line' variants. Then, viral titers data were analyzed in each time lapse with one-way ANOVA  
386 and Tukey's post-hoc. A p-value of  $p > 0,05$  or  $p > 0,001$  was considered significant.  
387 Statistical analysis was made in GraphPad Prism 5.0.

388

**389 Acknowledgments**

390 Thanks to Oswaldo Cruz Foudation and Aggeu Magalhães Institute.

391

## 392 **Authors Contributions**

393 Conceived and designed the experiments: SAO DMNM; Executed the experiments: JPL;

394 Analyzed the data: JPL LJP SAO DMNM; Contributed with tools: LJP SAO DMNM; Wrote

395 the paper: JPL SAO DMNM

396

## 397 **References**

398 [1] KIETZMANN, T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox*  
399 *biology*, v. 11, p. 622-630, 2017.

400 [2] PAROLA, M.; PINZANI, M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and  
401 clinical issues. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 35, p. 37-55, 2018.

402 [3] STEIN, Eva e colab. Heavy daily alcohol intake at the population level predicts the weight  
403 of alcohol in cirrhosis burden worldwide. *Journal of hepatology*, v. 65, n. 5, p. 998–1005, Nov  
404 2016.

405 [4] ROWE, Ian A. Lessons from Epidemiology: The Burden of Liver Disease. *Digestive*  
406 *Diseases*, v. 35, n. 4, p. 304–309, 2017.

407 [5] TOMLINSON, Lauren et al. In vitro Liver Zonation of Primary Rat Hepatocytes.  
408 *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, n. February, p. 17, 2019.

409 [6] BAIOCCHINI, Andrea et al. Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver  
410 Fibrosis Evolution. *Plos One*, v. 11, n. 3, p. e0151736, 2016.

411 [7] SEKI, Ekihiro; SCHWABE, Robert F. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links  
412 and key pathways. *Hepatology*, v. 61, n. 3, p. 1066–1079, 2015.

413 [8] PELLICORO, A. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a  
414 solid organ. *Nature reviews. Immunology*, v. 14, n. 3, 2014.

415 [9] ALTAMIRANO-BARRERA, Alejandra; BARRANCO-FRAGOSO, Beatriz; MENDEZ-  
416 SANCHEZ, Nahum. Management strategies for liver fibrosis. *Annals of hepatology*, v. 16, n.  
417 1, p. 48–56, 2017.

- 418 [10] GISSEN, P.; ARIAS, I. M. Structural and functional hepatocyte polarity and liver  
419 disease. *Journal of Hepatology*, v. 63, n. 4, p. 1023–1037, 2015.
- 420 [11] YOON, Y. J.; FRIEDMAN, S. L.; LEE, Y. A. Antifibrotic Therapies: Where Are We  
421 Now ? *Seminars in Liver Disease*, v. 36, n. 1/2016, p. 87–98, 2016.
- 422 [12] PUCHE, Juan E.; SAIMAN, Yedidya; FRIEDMAN, Scott L. Hepatic stellate cells and  
423 liver fibrosis. *Comprehensive Physiology*, v. 3, n. 4, p. 1473–1492, 2013.
- 424 [13] TRAUTWEIN, C.; FRIEDMAN, S. L.; SCHUPPAN, D.; PINZANI, M. Hepatic fibrosis:  
425 concept to treatment. *Journal of Hepatology*, v. 62, p. S15–S24, 2015.
- 426 [14] TSUCHIDA, Takuma; FRIEDMAN, Scott L. Mechanisms of hepatic stellate cell  
427 activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 14, n. 7, p. 397–411, 2017
- 428 [15] BÖTTCHER, K., PINZANI, M. Pathophysiology of liver fibrosis and the  
429 methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. *Advanced Drug*  
430 *Delivery Reviews*, v. 121, p. 3–8, 2017.
- 431 [16] MACHAIN-WILLIAMS, C., TALAVERA-AGUILAR, L.; CETINA-TREJO, R.  
432 Detection of hepatitis C virus coinfection in patients with dengue diagnosis. *Biomed Research*  
433 *International*, 2014.
- 434 [17] CHEN, Z. et al. A fatal yellow fever virus infection in China: description and lessons.  
435 *Emerging Microbes & Infections*, v. 5, n. 7, p. e69, 2016.
- 436 [18] WU, Yanhua et al. A unique case of human Zika virus infection in association with  
437 severe liver injury and coagulation disorders. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 11393, 2017.
- 438 [19] HASAN, S. Saif et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature*  
439 *Structural and Molecular Biology*, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2018.
- 440 [20] PLOURDE, A.R.; BLOCH, E.M. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging*  
441 *infectious diseases*, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, Jul 2016.
- 442 [21] DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I) Isolation and  
443 serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*,  
444 v. 46, n. 5, 1952.
- 445 [22] IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et*  
446 *Maladies Infectieuses*, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.
- 447 [23] CAO-LORMEAU, V.; MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*  
448 (London, England). England, Nov 2014.
- 449 [24] MUSSO, D; NILLES, E J. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area.  
450 *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.
- 451 [25] ROTH, A et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections -  
452 an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014.

- 453 Eurosurveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles, European communicable  
454 disease bulletin, v. 19, n. 41, Out 2014.
- 455 [26] KINDHAUSER, Mary Kay et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus.  
456 Bulletin of the World Health Organization, v. 94, n. February, p. 675–686, 2016.
- 457 [27] UGARTE, S. U. et al. Zika virus-induced neurological critical illness in Latin America:  
458 Severe Guillain-Barre Syndrome and encephalitis. Journal of Critical Care, v. 42, n. 2016, p.  
459 275–281, 2017.
- 460 [28] COSTA, F. et al. Emergence of Congenital Zika Syndrome: Viewpoint From the Front  
461 Lines. Annals of Internal Medicine, v. 164, n. 10, p. 689–691, 2016.
- 462 [29] AZEVEDO, R. S. S. et al. Zika virus epidemic in Brazil. I. Fatal disease in adults:  
463 Clinical and laboratorial aspects. J Clin Virol., v. 85, p. 56–64, 2016.
- 464 [30] HANNERS, N. W. et al. Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists  
465 Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. Cell Reports, v. 15, n.  
466 11, p. 2315–2322, 2016.
- 467 [31] CHEN, J. et al. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged  
468 persistency and cytopathic effects. Emerging Microbes & Infections, v. 6, n. 8, p. e77,  
469 2017.
- 470 [32] MANSUY, J.M.; DUTERTRE, M.; MENGELLE, C.; FOURCADE, C. et al. Zika virus:  
471 high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? Lancet Infectious  
472 Diseases, v. 16, p. 405- 405, 2016.
- 473 [33] DOWALL, S. D., GRAHAM, V. A., RAYNER, E., ATKINSON, B. et al. Susceptible  
474 Mouse Model for Zika Virus Infection. PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 5,  
475 e0004658, 2016.
- 476 [34] ADAMS WALDORF, K. M., STENCEL-BAERENWALD, J. E. et al. Fetal brain  
477 lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. Nature  
478 medicine, v. 22, n. 11, p.1256–1259, 2016.
- 479 [35] ZHANG, Z., SUN, M., DENG, J., YU, J., YANG, X., ZHAO, W. et al. Zika Virus  
480 Induced More Severe Inflammatory Response Than Dengue Virus in Chicken Embryonic  
481 Livers. Frontiers in microbiology, v.10, n. 1127, 2019.
- 482 [36] SHERMAN, K. E., ROUSTER, S. D., KONG, L. X., ALIOTA, M. T., BLACKARD, J.  
483 T., & DEAN, G. E. Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. PloS one, v. 14,  
484 n. 3, p. e0214016, 2019.
- 485 [37] NEUFELDT, C. J., CORTESE, M., SCATURRO, P., CERIKAN, B., WIDEMAN, J. G.,  
486 TABATA, K., MORAES, T., OLEKSIUK, O., PICHLMAIR, A., & BARTENSCHLAGER,  
487 R. ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion  
488 assembly. Nature microbiology, v. 4, n. 12, p. 2416-2429, 2019.
- 489 [38] CORTESE, M., GOELLNER, S., ACOSTA, E. G., NEUFELDT, C. J., OLEKSIUK, O.,



- 490 LAMPE, M., HASELMANN, U., FUNAYA, C., SCHIEBER, N., RONCHI, P., SCHORB,  
491 M., PRUUNSILD, P., SCHWAB, Y., CHATEL-CHAIX, L., RUGGIERI, A., &  
492 BARTENSCHLAGER, R. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication  
493 Factories. *Cell reports*, v. 18, n. 9, p. 2113–2123, 2017.
- 494 [39] CHATEL-CHAIX, L., CORTESE, M., ROMERO-BREY, I., BENDER, S.,  
495 NEUFELDT, C. J., FISCHL, W., SCATURRO, P., SCHIEBER, N., SCHWAB, Y.,  
496 FISCHER, B., RUGGIERI, A., & BARTENSCHLAGER, R. Dengue Virus Perturbs  
497 Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell host and*  
498 *microbe*, v. 20, n. 3, p. 342–356, 2016.
- 499 [40] LIANG, S., KISSELEVA, T., & BRENNER, D. A.. The Role of NADPH Oxidases  
500 (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Frontiers in physiology*, v.  
501 7, p. 1-7, 2016.
- 502 [41] ZHANG, Z., RONG, L., & LI, Y. P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress:  
503 Implications for Viral Pathogenesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2019, p.  
504 1409582, 2019.
- 505 [42] ALMEIDA, L. T., FERRAZ, A. C., DA SILVA CAETANO, C. C., DA SILVA  
506 MENEGATTO, M. B., DOS SANTOS PEREIRA ANDRADE, A. C., LIMA, R., CAMINI,  
507 F. C., PEREIRA, S. H., DA SILVA PEREIRA, K. Y., DE MELLO SILVA, B., PERUCCI, L.  
508 O., TALVANI, A., DE MAGALHÃES, J. C., & DE BRITO MAGALHÃES, C. L.. Zika  
509 virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in  
510 vivo. *Virus Research*, v.286, 2020.
- 511 [43] MEHTA, V. K., VERMA, R., GARG, R. K., MALHOTRA, H. S. et al. Study of  
512 interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with neurological manifestations of dengue.  
513 *Journal of postgraduate medicine*, v. 63, n. 1, p. 11–15, 2017.
- 514 [44] IANI, F. C., CALDAS, S., DUARTE, M. M., CURY, A. L., CECÍLIO, A. B. et al.  
515 Dengue Patients with Early Hemorrhagic Manifestations Lose Coordinate Expression of the  
516 Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 with the Inflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. *The*  
517 *American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 95, n. 1, p. 193–200, 2016.
- 518 [45] TILLU, H., TRIPATHY, A. S., RESHMI, P. V. & CECILIA, D. Altered profile of  
519 regulatory T cells and associated cytokines in mild and moderate dengue. *European journal of*  
520 *clinical microbiology and infectious diseases: official publication of the European Society of*  
521 *Clinical Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 453-61, 2016
- 522 [46] LAUR, F., MURGUE, B., DEPARIS, X., ROCHE, C., CASSAR, O., & CHUNGUE, E.  
523 Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in  
524 children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Transactions of the Royal Society*  
525 *of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 6, p. 654-6, 1998.
- 526 [47] AGARWAL, R., ELBISHBISHI, E. A., CHATURVEDI, U. C., NAGAR, R., &  
527 MUSTAFA, A. S. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue  
528 haemorrhagic fever. *International journal of experimental pathology*, v. 80, n. 3, p. 143–149,

529 1999.

530 [48] DE SOUSA, J. R., AZEVEDO, R., MARTINS FILHO, A. J., ARAUJO, M.,  
531 MOUTINHO, E., BALDEZ VASCONCELOS, B. C., CRUZ, A., OLIVEIRA, C. S.,  
532 MARTINS, L. C., BALDEZ VASCONCELOS, B. H., CASSEB, L., CHIANG, J. O.,  
533 QUARESMA, J., & VASCONCELOS, P. Correlation between Apoptosis and in Situ Immune  
534 Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. *The American journal of*  
535 *pathology*, v. 188, n. 11, p. 2644-2652, 2018.

536 [49] FRIEDMAN, Scott L. Hepatic fibrosis - Overview. *Toxicology*, v. 254, n. 3, p. 120–129,  
537 2008.

538 [50] GLASS, O., HENAO, R., PATEL, K., GUY, C. D., GRUSS, H. J., SYN, W. K.,  
539 MOYLAN, C. A., STREILEIN, R., HALL, R., MAE DIEHL, A., & ABDELMALEK, M. F.  
540 Serum Interleukin-8, Osteopontin, and Monocyte Chemoattractant Protein 1 Are Associated  
541 With Hepatic Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*  
542 *communications*, v. 2, n. 11, p. 1344–1355, 2018.

543 [51] ZIMMERMANN, H. W., SEIDLER, S., GASSLER, N., NATTERMANN, J., LUEDDE,  
544 T., TRAUTWEIN, C., & TACKE, F. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver  
545 diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS*  
546 *one*, v. 6, n. 6, p. e21381, 2011.

547 [52] CLÉMENT, S., PASCARELLA, S., CONZELMANN, S., GONELLE-GISPERS, C.,  
548 GUILLOUX, K., & NEGRO, F. The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-  
549 smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *Journal of*  
550 *hepatology*, v. 52, n. 5, p. 635–643, 2010.

551 [53] MEDIN, C.L., FITZGERALD, K.A., ROTHMAN, A.. Dengue virus nonstructural  
552 protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *Journal of virology*, v. 79, n.  
553 17, p. 11053-61, 2005.

554 [54] MEDIN, Carey L., ROTHMAN, Alan L. Cell type-specific mechanisms of interleukin-8  
555 induction by dengue virus and differential response to drug treatment. *The Journal of*  
556 *infectious diseases*, v. 193, n. 8, p. 1070-7, 2006.

557 [55] SHAH, S., MA, Y., SCHERZER, R., HUHN, G., FRENCH, A.L., PLANKEY, M.,  
558 PETERS, M.G., GRUNFELD, C., TIEN, P.C. Association of HIV, hepatitis C virus and liver  
559 fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. *AIDS*, v. 29, n. 11, p. 1325-  
560 33, 2015.