

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

RENAN WILLIAN ALVES

PAPEL DA PROTEÍNA CDC20 NA DESREGULAÇÃO DO CICLO CELULAR NA
INFECÇÃO INDUZIDA POR VÍRUS ZIKA

RECIFE
2019

RENAN WILLIAN ALVES

PAPEL DA PROTEÍNA CDC20 NA DESREGULAÇÃO DO CICLO CELULAR NA
INFECÇÃO INDUZIDA POR VÍRUS ZIKA

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A474p Alves, Renan Willian.
Papel da proteína CDC20 na desregulação do ciclo celular na infecção induzida por vírus Zika / Renan Willian Alves. - Recife: [s.n.], 2019.
145 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

Orientador: Rafael Freitas de Oliveira França.

1. Zika virus. 2. Proteínas Cdc20. 3. Divisão Celular.
I. França, Rafael Freitas de Oliveira. II. Título.

CDU 578

RENAN WILLIAN ALVES

PAPEL DA PROTEÍNA CDC20 NA DESREGULAÇÃO DO CICLO CELULAR NA
INFECÇÃO INDUZIDA POR VÍRUS ZIKA

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 02/04/2019

BANCA EXAMINADORA



Dr. Rafael Freitas de Oliveira França
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos orixás e aos meus guias espirituais por me acompanharem em cada etapa do meu trabalho e guiarem a minha trajetória. Dedico também ao meus amigos que me incentivaram todos os dias e me apoiaram nos momentos críticos. Por fim dedico a minha família, meus tios, minha prima e meu pais, por todo amor, carinho e apoio durante essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois sem ele nada disso seria possível. Aos meus pais Oxalá e Oxum, por cuidarem de mim, guardando e iluminando meus caminhos, me dando forças e sabedoria para enfrentar os obstáculos dessa trajetória. Aos meus guias espirituais por dividirem comigo essa jornada aqui na Terra e em especial à Dona Maria e Sr. Capa Preta pela infinita sabedoria e todos os conselhos e por me mostrarem a luz em meio a escuridão.

Agradeço ao meu orientador Dr. Rafael França, pela paciência, ensinamentos e confiança em mim depositado durante esses dois anos de orientação. As suas críticas, discussões e sugestões foram essenciais para a realização para deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos pernambucanos Débora, Deborah, Fernando e Willyenne por se tornarem minha família e mesmo longe de casa por fazer desta “terra do frevo” o meu novo lar. Aos meus amigos do grupo de pesquisa do *Team Papito* (Aline, Armando, Elisa, Lili, Leila Morganna, Pablo, Pedro, Sayonara, Thais e Thaise) pelos desabafos, conselhos e ensinamentos, por estarem comigo todos os dias, nos piores e melhores momentos, vocês me deram forças e deram o direcionamento no caminho. Aos meus amigos (César, Jéssica, Matheus, Taís e Thaís) que mesmo longe, estiveram comigo e me incentivaram nessa etapa, vocês são amigos de uma vida inteira.

À minha família que foi e é até o hoje o meu suporte e exemplo de vida, vocês foram essenciais para a construção do meu caráter e me ensinaram a nunca desistir diante das adversidades. Aos meus tios Angela e Lauro, por serem meus “segundos pais”, a minha prima-irmã Letícia pelos nossos momentos juntos. Ao meu pai, Delcino, pelo amor, dedicação durante a minha criação me mostrando o caminho correto a ser seguido. À minha mãe, Rose, por todo amor, incentivo, e carinho incondicional, por ser o meu porto seguro, minha maior fonte de inspiração, orgulho e força na vida.

À CAPES, à FIOCRUZ/PE, ao Instituto Aggeu Magalhães e ao Departamento de Virologia e Terapia Experimental pelo suporte financeiro, técnico e estrutural para a execução deste trabalho.

“Algumas pessoas olham o mundo e perguntam: Por quê?

Eu penso em coisas que nunca existiram e pergunto: Por quê não?”

George Bernard Shaw

ALVES, Renan Willian. **Papel da proteína Cdc20 na desregulação do ciclo celular na infecção induzida por vírus zika**. 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

O vírus zika tornou-se um problema de saúde pública global devido a sua alta capacidade de disseminação e infecção em humanos e por estar associado com o aumento na incidência de distúrbios neurológicos como Síndrome Congênita do Zika. O vírus apresenta apresenta tropismo por células neuronais levando a morte e inibindo a proliferação e diferenciação dessa linhagem celular. O vírus utiliza da maquinaria celular no processo de replicação e como consequência causam alterações no funcionamento dessas células. Nesse cenário, estudar as interações das proteínas virais com as proteínas das células permite compreender os mecanismos da patogenia da infecção viral. Neste projeto, a nossa hipótese seria que as proteínas estruturais do zika interagem diretamente com a proteína de divisão celular. Para isso, analisamos a interação da proteínas estruturais e não-estruturais do ZIKV, individualmente, com a expressão da proteína Cdc20 em células SH-SY5Y, que por sua vez, está envolvida na ativação/inativação do APC, complexo proteico multifuncional relacionado principalmente com a regulação do ciclo de divisão celular. Nossos resultados mostram que em células neuronais infectadas pelo ZIKV ocorre downregulação da expressão de Cdc20 após 48 pós infecção. Análise da expressão proteica nessa mesma linhagem celular transfectadas com vetores contendo os genes estruturais e não estruturais do ZIKV revelaram que as proteínas E e prM inibem a expressão de Cdc20, sugerindo que essas proteínas desregulam o funcionamento do APC. Além disso, avaliação da proliferação e do ciclo celular por citometria de fluxo, revelaram que as proteínas virais inibem a proliferação e aumentam a porcentagem de células na fase G0-G1 do ciclo. De modo geral, esses resultados sugerem possível interação das proteínas E, prM e NS5 com a proteínas Cdc20 causando desregulação do ciclo celular e conseqüentemente comprometendo a capacidade proliferativa dessa linhagem celular.

Palavras-chaves: Vírus Zika. Proteína Cdc20. Divisão celular

ALVES, Renan Willian. **Papel da proteína Cdc20 na desregulação do ciclo celular na infecção induzida por vírus zika**. 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Zika virus has become a global public health problem because of its high dissemination and infection capacity and is associated with the increased incidence of neurological disorders such as Congenital Zika Syndrome. The virus has high tropism by neuronal cells leading to death and inhibiting the proliferation and differentiation of this cell line. The virus uses cellular machinery in the replication process and as a consequence causes changes in the functioning of these cells. In this scenario, studying the interactions of viral proteins with cell proteins allows us to understand the mechanisms of the pathogenesis of viral infection. In this project, our hypothesis would be that Zika structural proteins interact directly with cell division protein. For this, we analyzed the interaction of the structural and nonstructural proteins of ZIKV individually with the expression of Cdc20 protein in SH-SY5Y cells, which in turn is involved in the activation / inactivation of APC, a multifunctional protein complex related mainly to the regulation of the cell division cycle. Our results show that in ZIKV-infected neuronal cells down-regulation of Cdc20 expression occurs after 48 post infection. Analysis of protein expression in this same cell line transfected with vectors containing the structural and nonstructural ZIKV genes revealed that the E and prM proteins inhibit Cdc20 expression, suggesting that these proteins disrupt APC function. In addition, proliferation and cell cycle evaluation by flow cytometry revealed that viral proteins inhibit proliferation and increase the percentage of cells in the G0-G1 phase of the cycle. Overall, these results suggest possible interaction of E, prM and NS5 proteins with Cdc20 proteins causing cell cycle dysregulation and consequently compromising the proliferative capacity of this cell line.

Key words: Zika virus. Cdc20 proteins. Cell division.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore filogenética dos 29 genomas disponíveis do ZIKV.....	23
Figura 2- Representação esquemática mostrando a distribuição histórica do vírus Zika, 1947-2016.....	25
Figura 3- Casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016, 2017 e 2018.....	28
Figura 4- Casos notificados de microcefalia ZIKV por região do Brasil, até abril de 2016.....	29
Figura 5- Genoma e proteínas do ZIKV	30
Figura 6- Estrutura da partícula viral do ZIKV	32
Figura 7- Ciclo replicativo do ZIKV.....	35
Figura 8- Ciclo selvagem e urbano do ZIKV	36
Figura 9- Sinais clínicos da infecção pelo ZIKV	40
Figura 10- Resposta imune inata em células infectadas pelo ZIKV	44
Figura 11- Antagonismo das proteínas não estruturais do ZIKV na resposta imune inata.....	47
Figura 12- Representação esquemática das alterações do ZIKV durante a divisão celular	49
Figura 13- Estrutura do complexo APC	51
Figura 14- Regulação da atividade do APC durante o ciclo celular	52
Figura 15- O papel do APC e seus co-fatores CDC20 e CDH-1 durante a progressão do ciclo de divisão celular	53
Figura 16- Representação do plasmídeo pCDH e suas regiões	60
Figura 17- Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do DNA dos clones E, prM, Cap, NS1 e NS2A, selecionados para verificação dos insertos	74
Figura 18- Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do DNA dos clones NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 selecionados para verificação dos insertos.....	75
Figura 19- Perfil da corrida eletroforética dos produtos da reação de amplificação do vetores contendo os insertos do ZIKV usando os primers desenhados para o sequenciamento	76
Figura 20- Eletroferograma parcial do sequenciamento dos genes E, prM, Cap, NS1 e NS2A	78

Figura 21- Eletroferograma parcial do sequenciamento dos genes NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5	78
Figura 22- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 2 µL de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 24 horas pós-transfecção.	79
Figura 23- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 3 µL de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 24 horas pós-transfecção.	80
Figura 24- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 2µL de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 48 horas pós-transfecção.	81
Figura 25- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 3µL de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 48 horas pós-transfecção	82
Figura 26- Imunofluorescência indireta para ZIKV e suas proteínas em células SH-SY5Y usando os anticorpos anti-E, anti-prM, anti-Cap.....	83
Figura 27- Imunofluorescência indireta para as proteínas do ZIKV em células SH-SY5Y usando os anticorpos anti-NS1, anti-NS2B, anti-NS3, anti-NS4B e anti-NS5	84
Figura 28- Análise da expressão da proteína Cd20 em células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV	89
Figura 29- Análise da expressão da proteína Cd20 em células SH-SY5Y transfectadas com plasmídeos do ZIKV.....	90
Figura 30- Perfil proliferativo de células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas	91
Figura 31- Perfil do ciclo celular de células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas..	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Descrição dos plasmídeos contendo os genes do ZIKV	60
Quadro 2- Enzimas usadas para o ensaio de digestão de acordo com o gene inserido	63
Quadro 3- Sequência dos primers externos e internos utilizados para a amplificação e sequenciamento dos genes do ZIKV	65
Quadro 4- Protocolo de ciclagem utilizados para PCR	65
Quadro 5- Identidade encontrada entre a sequência nucleotídeos dos genes do ZIKV inseridos nos vetor pCDH e dados genéticos disponíveis no GenBank por meio do programa BlastX	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ad	Adenovírus
APC	<i>Anaphase-promoting complex</i>
bp	Pares de base
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Proteína do capsídeo
CaCl₂	Cloreto de cálcio
Cdc20	<i>Cell-division cycle protein 20</i>
CHKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus da Dengue
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i>
E	Proteína do envelope
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Emi1	<i>Early mitotic inhibitor</i>
EtBr	Brometo de Etídio
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h.p.i	Horas pós-infecção
HCMV	Citomegalovírus humano
HPV	Papilomavírus humano
HTLV-1	Vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1
IFN	Interferon
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
LB	Meio Luria-Bertani
M	Proteína de membrana
MCC	<i>Mitotic checkpoint complex</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
MFI	Intensidade média de fluorescência
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>

MTase	Metiltransferase
NF-κB	Fator Nuclear Kappa-B
NS	Proteínas não estruturais
OD	Densidade ótica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	Tampão fosfato salino com Tween 20
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldeído
PFU	Unidades formadoras de placas
PI	Iodeto de propídeo
prM	Proteína precursora de membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo endoplasmático
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
SAC	Controle de montagem do fuso mitótico
SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SFB	Soro Fetal Bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
ssRNA	<i>Single stranded RNA</i>
T.A	Temperatura ambiente
TLR	<i>Toll like receptors</i>
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre amarela
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
mL	Mililitros
μL	Microlitros
RCF	Força gravitacional
rpm	Rotações por minuto
mM	Milimolar
μg	Microgramas
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	22
2.1	Histórico do ZIKV	22
2.2	Epidemiologia	25
2.3	Estrutura e Genoma Viral	29
2.4	Ciclo de Replicação	33
2.5	Transmissão	35
2.5.1	<i>Transmissão Vetorial</i>	36
2.5.2	<i>Transmissão Não-vetorial</i>	37
2.6	Sinais e Sintomas Clínicos	38
2.7	Diagnóstico	40
2.8	Tratamento	42
2.9	Resposta imune frente à infecção pelo ZIKV	43
2.10	Patogênese do ZIKV	45
2.11	APC e Cdc20	51
3	JUSTIFICATIVA	55
4	OBJETIVOS	56
4.1	Objetivo Geral	56
4.2	Objetivos Específicos	56
5	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	57
5.1	Local do Experimento	57
5.2	Linhagens Celulares	57
5.2.1	<i>Células VERO (ATCC® CCL81TM)</i>	57
5.2.2	<i>Células SH-SY5Y (ATCC®CRL2266TM)</i>	58
5.3	Vírus Zika	58
5.3.1	<i>Identificação da amostra viral</i>	58
5.3.2	<i>Produção do estoque viral</i>	58
5.3.3	<i>Titulação do estoque viral</i>	59
5.4	Vetor pCDH contendo os genes do ZIKV	59
5.5	Células DH5 α	61

5.5.1	<i>Preparação de células DH5α quimicompetentes</i>	61
5.5.2	<i>Transformação bacteriana</i>	61
5.5.3	<i>Extração do DNA plasmidial</i>	62
5.5.4	<i>Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição</i>	62
5.5.5	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	63
5.5.6	<i>Quantificação do DNA plasmidial</i>	64
5.5.7	<i>Sequenciamento</i>	64
5.5.7.1	<i>Desenho dos primers</i>	64
5.5.7.2	<i>PCR</i>	65
5.5.7.3	<i>Sequenciamento e análise</i>	66
5.6	<i>Infecção de células SH-SY5Y</i>	66
5.7	<i>Transfecção das células SH-SY5Y</i>	66
5.8	<i>Preparação dos extratos protéicos</i>	67
5.9	<i>Western blotting</i>	68
5.10	<i>Imunofluorescência</i>	69
5.11	<i>Ensaio de proliferação celular</i>	70
5.12	<i>Ensaio ciclo celular</i>	71
5.13	<i>Análise Estatística</i>	71
5.14	<i>Considerações éticas</i>	72
6	RESULTADOS	73
6.1	<i>Caracterização dos genes clonados nos vetores</i>	73
6.2	<i>Confirmação dos genes por digestão enzimática</i>	73
6.2.1	<i>Amplificação dos insertos do ZIKV por PCR</i>	75
6.2.2	<i>Sequenciamento dos genes ZIKV</i>	76
6.3	<i>Padronização das transfecções em células neuronais</i>	80
6.4	<i>Imunofluorescência indireta confirmatória da transfecção das células SH-SY5Y</i>	86
6.5	<i>Expressão da proteína Cdc20 em células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas</i>	88
6.1	<i>Avaliação do perfil proliferativo das células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas</i>	90
6.2	<i>Avaliação do ciclo celular em células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas</i>	92

7 DISCUSSÃO.....	94
8 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
APÊNDICE A- MAPA DO VETOR PCDH-CAP.....	113
APÊNDICE B- MAPA DO VETOR PCDH-PRM.....	114
APÊNDICE C- MAPA DO VETOR PCDH-E.....	115
APÊNDICE D- MAPA DO VETOR PCDH-NS1.....	116
APÊNDICE E- MAPA DO VETOR PCDH-NS2A.....	117
APÊNDICE F- MAPA DO VETOR PCDH-NS2B.....	118
APÊNDICE G- MAPA DO VETOR PCDH-NS3.....	119
APÊNDICE H- MAPA DO VETOR PCDH-NS4A.....	120
APÊNDICE I- MAPA DO VETOR PCDH-NS4B.....	121
APÊNDICE J- MAPA DO VETOR PCDH-NS5.....	122
APÊNDICE J- MANUSCRITO DO ARTIGO.....	123

1 INTRODUÇÃO

Os Flavivírus pertencem à família *Flaviridae* e são vírus emergentes, transmitidos por artrópodes, principais causadores de doenças infecciosas e representam um grande desafio para a saúde pública global (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009). O vírus zika (ZIKV), assim como os demais membros da família, é um vírus envelopado, com capsídeo icosaédrico, RNA gênomico de cadeia simples e de sentido positivo que codifica todas as proteínas do vírus (MEDIN; ROTHMAN, 2017).

A replicação do seu material genético ocorre no citoplasma das células hospedeiras e durante o processo de tradução uma única molécula de poliproteína é sintetizada, a qual, posteriormente será clivada, por proteases virais e do hospedeiro, nas proteínas virais (YUN; LEE, 2017). Ao todo o ZIKV contém dez proteínas, três proteínas estruturais: o capsídeo (C), a proteína precursora de membrana (prM), o envelope (E) e sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (MEDIN; ROTHMAN, 2017).

O ZIKV atraiu pouca atenção da comunidade médica e científica desde sua descoberta e foi somente por causa dos grandes surtos associados à introdução do ZIKV no Ocidente que obteve importância na comunidade científica. O vírus foi identificado pela primeira vez, em 1947 na floresta do Zika, a partir de amostras obtidas de macacos *rhesus* e alguns anos mais tarde, em 1952, houve o primeiro caso confirmado de infecção em humanos (DICK *et al.*, 1952; GUBLER *et al.*, 2017). No período de 1952-2007 os casos de infecção em humanos eram esporádicos e condensados nos continentes africanos e asiático, até que no ano de 2007 houve um surto da febre pelo ZIKV nas Ilhas de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, sendo reconhecido como o primeiro surto de grande importância (PLOURDE; BLOCH, 2016). Seis anos depois, um surto de proporções maiores aconteceu na Polinésia Francesa, na região do pacífico Sul, seguido por pequenos surtos em outras ilhas da região do Pacífico (BASILE *et al.*, 2017).

O vírus foi introduzido no Brasil entre 2013 e 2015, provavelmente pela rota do Pacífico e causou um grande surto que atingiu o pico em novembro de 2015, rapidamente se espalhando pelo país e pelas Américas (BAUD *et al.*, 2017).

Até a semana epidemiológica 52 do ano de 2018, o Brasil registrou 8.680 casos prováveis de febre pelo ZIKV dos quais, 45,9% foram confirmados como positivos. De acordo com os dados divulgados, a região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de

incidência com uma média de 10,8 casos por cem mil habitantes, em 2018, e 35,9 casos por cem mil habitantes no ano de 2017. A região Nordeste registrou, em 2018, um total de 7.544 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, com destaque, para o estado da Bahia com quase 800 casos enquanto que no estado de Pernambuco foram notificados 109 casos de doença aguda pelo vírus Zika (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018).

A transmissão viral ocorre pela picada de mosquitos fêmeas de *Aedes aegypti*, durante o momento da hematofagia a fêmea injeta o vírus na pele do hospedeiro (PLOURDE; BLOCH, 2016). Diversos estudos mostraram que além da transmissão vetorial outros modos de transmissão são possíveis para o ZIKV como, transmissão sexual, congênita e por transfusão de sangue (BESNARD *et al.*, 2014; BEUTNER; KLUSSMANN; GUNTINAS-LICHIUS, 2016; ROBIN *et al.*, 2015; SHARMA; LAL, 2017).

O período de incubação da infecção varia, em média, de 3-10 dias com sintomas típicos de febre, *rash* cutâneo, artralgia, mialgia, cefaléia e conjuntivite, no entanto, 80% dos pacientes infectados apresentam a forma assintomática da doença (BASILE *et al.*, 2017). Apesar da forma assintomática ser a mais frequente, alguns casos mais graves foram associados com complicações neurológicas como Síndrome de Guillain-Barré (SGB), mielite, meningoencefalite e casos de microcefalia em recém-nascidos (BRITO, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016).

O ZIKV é capaz de infectar e se replicar em uma ampla diversidade de tipos celulares como, fibroblastos, queratinócitos, células dendríticas imaturas e células neuronais induzindo a morte celular nas mesmas. Apesar de evidências mostrarem que o ZIKV apresenta tropismo por células progenitoras neuronais comprometendo o desenvolvimento cerebral (BAUD *et al.*, 2017; MUSSO; GUBLER, 2016; ZHANG, N. *et al.*, 2016). Hamel *et al.* (2015) constataram que os receptores DC-SIGN, AXL, Tyro-1 e TIM são os principais receptores envolvidos na entrada do vírus à célula hospedeira. A entrada do vírus ocorre por via endocítica por meio de interações da proteína E com os fatores de adesão celular do hospedeiro e receptores fosfatidilserina. Uma vez dentro do endossomo ocorre fusão das membranas virais e endossomais permitindo, assim, a liberação do RNA genômico para o citoplasma e conseqüentemente o início da tradução. As proteínas não estruturais auxiliam no processo de replicação do material genético e na montagem das partículas virais imaturas, que irão adquirir sua forma final após clivagem da proteína prM em proteína

de membrana (M), em seguida, o vírus é liberado via exocitose (HAMEL *et al.*, 2015; ROBY *et al.*, 2015).

A infecção pelo ZIKV ativa respostas imunológicas que tentam conter o avanço do vírus. A principal via ativada nesse caso é a via do interferon (IFN) que é ativada pela presença do material genético viral detectado pelos *Toll like receptors* (TLR). Essa sinalização leva à ativação dos fatores regulatórios que estimulam a produção de IFN. Este, quando secretado se liga a receptores específicos e estimula a transcrição de genes estimulados por IFN (ISGs) que codificam proteínas que inibem a replicação e induzem um estado antiviral (KUMAR *et al.*, 2016; LERAT *et al.*, 2017; LESTER; LI, 2013;). Porém, alguns estudos têm mostrado que o ZIKV é capaz de evadir e inibir as respostas antivirais, por meio da interação das suas proteínas não estruturais com receptores das vias de indução e sinalização do IFN (BOWEN *et al.*, 2017; GRANT *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016) .

No momento, não existe nenhuma vacina ou medicamento anti-ZIKV disponível e o tratamento mais recomendado visa aliviar os sintomas dos casos sintomáticos, fato que evidencia a importância de estudos que busquem novas medidas profiláticas ou novos alvos terapêuticos que auxiliem no combate e redução da infecção . Nesse contexto, é essencial compreender os mecanismos moleculares da patogenia do ZIKV, buscando possíveis vias de bloqueio. O ZIKV assim como os demais vírus, durante o seu ciclo de replicação, infecta as células e utiliza da maquinaria do hospedeiro para originar novas partículas virais infecciosas. Diversos estudos apontam que as proteínas não estruturais do vírus estão, diretamente ou indiretamente, envolvidas na patogênese da infecção viral. A microcefalia primária e o comprometimento do desenvolvimento neuronal são consequências principais da ação depletores de células neurais progenitoras oriundas de defeitos no centrôssomos, diferenciação prematura e/ou morte celular (GABRIEL *et al.*, 2017; GARCEZ *et al.*, 2016; 2017; ONORATI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016;). Abordar essas questões no contexto do desenvolvimento do sistema nervoso central é importante para entender os mecanismos de tropismo e neuropatogênese do ZIKV. Com base nessa abordagem, o presente trabalho propôs analisar a expressão da proteína Cdc20, molécula importante no controle da mitose, e caracterizar uma possível via de interação entre as proteínas do vírus com a célula hospedeira o que poderia explicar a capacidade do vírus em perturbar o ciclo de divisão celular e comprometer a capacidade de proliferação e diferenciação em células neuronais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

O ZIKV é um vírus emergente transmitido pelos mesmos vetores artrópodes de outras arboviroses de grande importância para o cenário da saúde global, e pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae* e tem as características semelhantes aos outros flavivírus de relevância à saúde pública, como vírus da dengue (DENV) e febre amarela (YFV) (FAYE *et al.*, 2014).

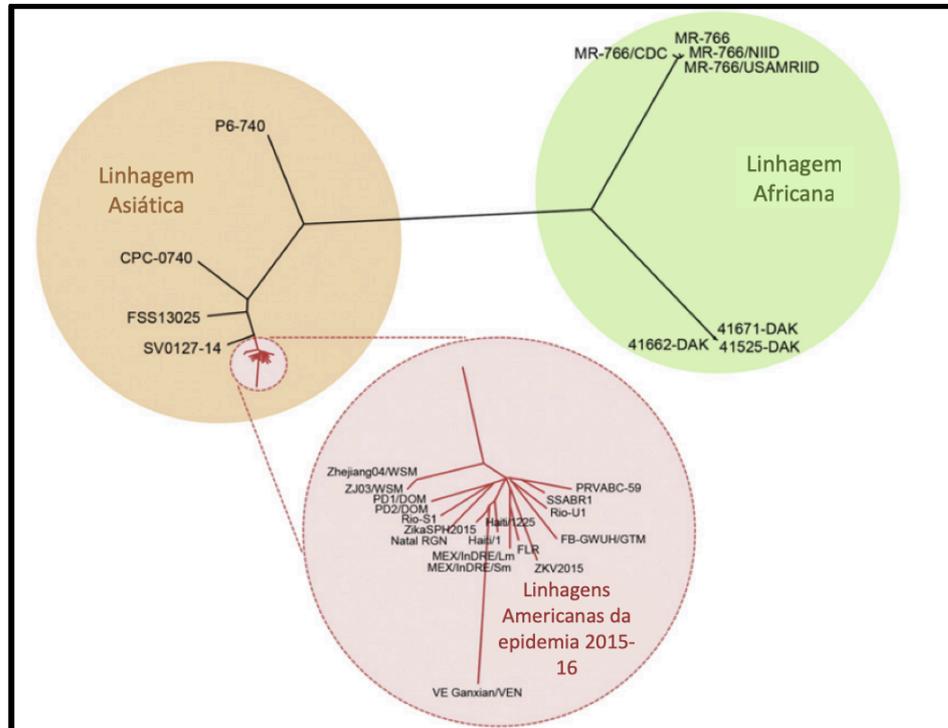
2.1 Histórico do ZIKV

O vírus foi identificado pela primeira vez, em 1947, quando cientistas do *Rockefeller Foundation* conduziam pesquisa de vigilância na floresta de Zika em Uganda (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Os pesquisadores isolaram o vírus em amostras obtidas de macacos *rhesus* febris mantidos em uma plataforma no dossel da floresta durante estudos para identificar possíveis vetores da YFV (GUBLER *et al.*, 2017). Esta amostra nomeada, posteriormente, como MR-766 foi o protótipo da cepa africana do ZIKV (SONG *et al.*, 2017). Pouco tempo depois, em janeiro de 1948, o vírus foi isolado de um *pool* de mosquitos da espécie *Aedes africanus* capturados na mesma região (DICK *et al.*, 1952).

Os primeiros casos da infecção em humanos foram relatados por MacNamara na Uganda e na Tanzânia, em 1952, em um estudo que buscava demonstrar a presença de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV no soro de pacientes dessa mesma região (BASILE *et al.*, 2017). Fora do continente africano, o vírus foi isolado pela primeira vez em mosquitos *Aedes aegypti* na Malásia em 1966, sendo esta amostra identificada como a primeira cepa não africana do vírus, denominada então P6-740 (SONG *et al.*, 2017). As cepas que emergiriam nos surtos futuros no Pacífico, nas Américas e na Ásia pertencem à linhagem asiática (**Figura 1**) (BAUD *et al.*, 2017). Os casos de infecções em humanos na Ásia foram relatados somente em 1977 na região da Indonésia (OLSON *et al.*, 1981) e durante o período de 1969-1983 o ZIKV expandiu-se para a área equatorial da Ásia, incluindo Índia, Indonésia, Malásia e Paquistão, regiões onde o vírus foi detectado em humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Apesar de casos esporádicos da infecção viral em humanos serem relatados na África e Ásia, o ZIKV não despertou a atenção dos

estudos na literatura nos últimos 70 anos devido às suas manifestações clínicas leves e à sua dispersão limitada em regiões geográficas restritas (KONG *et al.*, 2018).

Figura 1- Árvore filogenética dos 29 genomas disponíveis do ZIKV



Fonte: Song *et al.* (2017, tradução nossa)

O vírus só passou a receber atenção global na última década. Em 2007, o primeiro grande surto fora da África e da Ásia ocorreu na região das Ilhas Yap nos Estados Federados da Micronésia, na região nordeste do Oceano Pacífico (YUN; LEE, 2017), sendo esse surto epidêmico associado a febre, *rash* cutâneo, artralgia e conjuntivite. O segundo surto de alto impacto aconteceu seis anos mais tarde em 2013 na Polinésia Francesa região centro-sul do Oceano Pacífico, que resultou em cerca de 30.000 casos, segundo estimativas do governo (DUFFY *et al.*, 2009). Diferente do primeiro surto observou-se um aumento de vinte vezes na incidência da SGB durante a epidemia de 2013 (OEHLER *et al.*, 2014) sugerindo a hipótese da associação do aumento da incidência nos casos de SGB com a infecção pelo ZIKV (YUN 2016). Em 2013, o primeiro caso de infecção por ZIKV foi confirmado na Europa, em um viajante que retornava da Tailândia (ZANLUCA, 2015). Outros casos autóctones também foram descritos no Canadá, Estados Unidos, Austrália, Japão, Noruega e Itália (FONSECA *et al.*, 2014; KUTSUNA, 2014; KWONG *et al.*, 2013; SUMMERS *et al.*, 2015; ZAMMARCHI *et al.*, 2015).

No início de 2014 as autoridades chilenas confirmaram o primeiro surto autóctone do ZIKV na Ilha da Páscoa, localizada no Pacífico Sul aproximadamente a 3800km do continente sul-americano (ZANLUCA *et al.*, 2015). Quase um ano depois, casos de pacientes apresentando sintomas semelhantes a infecção pelo vírus da dengue foram notificados na cidade de Natal, no estado do Rio Grande do Norte (ZANLUCA *et al.*, 2015). Os sinais clínicos incluíam febre moderada, conjuntivite, dor de cabeça, dores retro orbitais, mialgia e artralgia. Apesar disso, a entrada do ZIKV no Brasil é assunto muito discutido entre os cientistas na literatura. Estudos realizados por Faria *et al.*, 2016, mostraram que o Brasil vivenciou um aumento no número de viajantes nos dois anos antes ao surto epidêmico de 2015, de 3775 viajantes por mês no início de 2013 a 5754 passageiros por mês em 2014, aumento de 132% de viajantes em 12 meses. Algumas hipóteses sugerem que a entrada do ZIKV no Brasil ocorreu durante o evento da 2014 FIFA *World Cup* ou no evento Va'a de canoagem sediado em agosto de 2014 no Rio de Janeiro (MARCONDES; XIMENES, 2016; MUSSO, 2015). Entretanto, Faria *et al.*(2015) sugeriram que a entrada do ZIKV no país ocorreu durante o torneio de futebol das Copas das Confederações em junho de 2013, enquanto Campos *et al.* (2018), em um estudo filogenético, sugerem que vírus entrou no país no final de 2013 por uma nova rota a partir da América Central e do Caribe, provavelmente chegou ao Brasil vindo do Haiti trazido por militares que participaram de operações nesse país (CAMPOS *et al.*, 2018).

O vírus, no início, foi considerado inofensivo sendo associado somente a um surto de doença exantemática aguda. Foi somente em outubro de 2015 que os pesquisadores observaram um aumento no número de casos de recém nascidos com sinais de microcefalia, na região do Nordeste do Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 2016). Especialistas e pesquisadores da cidade de Recife começaram a estudar a hipótese da associação entre a infecção por ZIKV em grávidas com o aumento de casos de neonatos com microcefalia. Pesquisadores da FIOCRUZ/PE conduziram um estudo, no qual, amostras dos casos confirmados de microcefalia foram submetidas a teste laboratoriais para detecção do ZIKV: qRT-PCR ou captura de IgM contra ZIKV em amostras biológicas (soro ou líquido cefalorraquidiano) (ARAÚJO, *et al.*, 2017; SOUZA, *et al.*, 2016;). Diante desses resultados, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o zika como um problema de saúde pública de interesse internacional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). As condições climáticas adequadas e vetores competentes para a replicação viral contribuíram por adaptar e disseminar

o vírus pelo território nacional, a partir do Brasil, ZIKV atingiu outras regiões das Américas (**Figura 2**). Como previsto, o vírus aumentou o raio da sua expansão geográfica atingindo a região da América do Norte, com o primeiro caso confirmado no sul da Flórida, em 2016 (BOGOCH *et al.*, 2016; FAUCI; MORENS, 2016), e posteriormente sendo identificado no estado do Texas, Estados Unidos (CDC, 2016) e desde o segundo semestre de 2017 não foram relatados casos de transmissão ativa pelo vírus nos Estados Unidos (PAHO, 2017).

Figura 2- Representação esquemática mostrando a distribuição histórica do vírus Zika, 1947-2016



Fonte: Lancaster *et al.* (2016, tradução nossa)

Desde dezembro de 2016, a transmissão autóctone ativa do ZIKV foi considerada contínua em grande parte da América Latina, assim como em partes das Ilhas do Pacífico e do sudeste asiático (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2016; CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2016). Em um artigo de revisão sobre o ZIKV, Yun *et al.*, 2017 predisseram que é alta a probabilidade do ZIKV se tornar endêmico no Hemisfério Ocidental, assim como na África, sudeste asiático no Hemisfério Oriental.

2.2 Epidemiologia

Apesar de ter sido identificado pela primeira vez no sangue de macacos *rhesus* em 1947, o primeiro caso em humanos foi reportado, somente em 1954, durante um

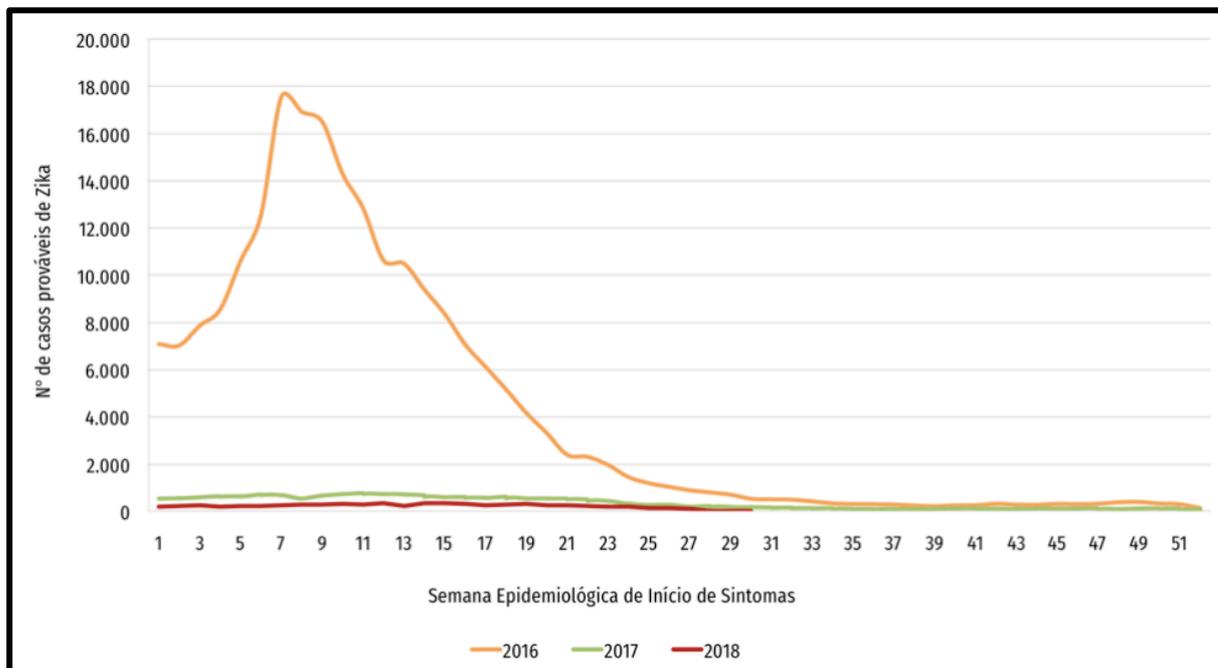
surto de icterícia na Nigéria (MITTAL *et al.*, 2017). Devido a dificuldade de técnicas de identificação viral o caso só foi confirmado em 1963, a partir de um ensaio de neutralização cruzada com o soro de macacos infectados com o ZIKV (SIMPSON, 1964). Entretanto, em um estudo realizado por Smithburn (1952), o autor já propunha a capacidade do vírus em infectar humanos ao realizar estudo com o soro de indígenas residentes na região da Uganda e Tanganica. Das 297 amostras analisadas, 38 (12,8%) pacientes possuíam anticorpos neutralizantes contra o vírus indicando que o ZIKV era prevalente e disseminado na população do estudo (SMITHBURN, 1952). Esses resultados permitiram concluir que ZIKV possuía a capacidade de infectar humanos e causar infecções ainda desconhecida na época.

No período entre 1964-1981, somente 14 casos em humanos foram confirmados na literatura médica, resultado esse muitas vezes subnotificados, devido ao número de casos de infecções assintomáticas (IMPERATO, 2016). Os casos foram documentados em países da África e da Ásia: dois casos confirmados na Uganda (SIMPSON, 1964) além de estudos realizados por Dick *et al.* (1953) mostraram que 10-20% da população apresentava anticorpos contra o vírus (DICK, 1953); cinco casos na Nigéria, país no qual 40% da população apresentou anticorpos neutralizantes para o ZIKV (FAGBAMI, 1979) e por fim sete casos confirmados na Indonésia (OLSON *et al.*, 1981). No entanto, estudos de soro vigilância realizados na década de 1950, 1960 e 1970 sugeriram fortemente que o ZIKV possuía ampla distribuição geográfica na África tropical e na Ásia (MUSSO; GUBLER, 2016), desde então o vírus foi descrito como causador de casos esporádicos de infecção em humanos nessas regiões do globo.

Ainda assim, o ZIKV recebeu pouca atenção na literatura médica até o início dos anos 2000 (YUN; LEE, 2017) quando dois grandes surtos ocorreram em regiões sem histórico prévio de casos de infecção pelo vírus. O primeiro grande surto ocorreu, em 2007, nas Ilhas Yap nos Estados Federados da Micronesia, Duffy *et al.* 2009 confirmaram que 73% dos residentes tinham sido recentemente infectados pelo ZIKV (DUFFY *et al.*, 2009). Em outra trabalho, realizado por Duffy *et al.* (2009), conduzido no período pós-surto os pesquisadores buscaram anticorpos contra ZIKV na população e concluíram que aproximadamente três quartos das ~ 7.000 pessoas com mais de 3 anos de idade tinham sido expostas ao ZIKV, mas apenas uma em cada cinco pessoas infectadas havia desenvolvido sintomas clínicos relacionados à infecção por ZIKV, sem complicações graves (DUFFY *et al.*, 2009). O segundo

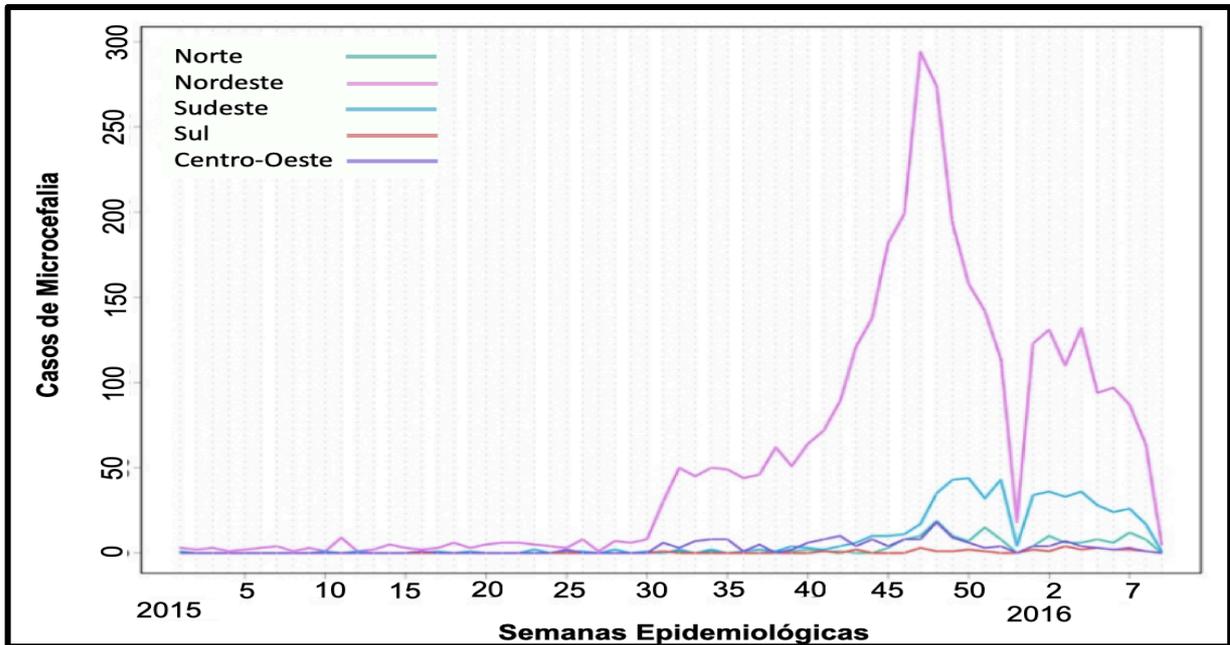
destaque do vírus aconteceu na Polinésia Francesa em 2013, no qual estima-se que 11% da população de aproximadamente 270.000 habitantes entrou em contato com o vírus e apresentou sinais clínicos de infecção por ZIKV (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014). Diferente do primeiro surto, durante a epidemia de 2013, houve um aumento de quase vinte vezes na incidência de SGB nos indivíduos infectados pelo ZIKV (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014).

Em meados de 2015 o ZIKV se tornou uma ameaça nas Américas e desde o final de 2014 atingiu milhares de pacientes na região Nordeste do Brasil, principalmente os estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Paraíba e Sergipe {Formatting Citation}. No começo de dezembro de 2015, 18 estados já tinham confirmado casos da transmissão viral nas regiões Nordeste, Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país (MUSSO *et al.*, 2016; GUBLER, 2016). Somente no Brasil foram notificados mais de 200.000 casos até o final do ano de 2016 (**Figura 3**) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018). De acordo, com o Boletim Epidemiológico, divulgado pelo Ministério da Saúde, em 2018 até a 42ª semana epidemiológica foram registrados 7.544 casos prováveis de febre pelo vírus zika no território brasileiro, representando uma redução de 55% dos casos, quando comparado com o mesmo período em 2017. Ainda segundo o documento, as regiões Centro-Oeste e Norte do país foram as que apresentaram maior taxa de incidência: 35,9 casos/100 mil hab. e 13,9 casos/100 mil hab., respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018). Somente na região Nordeste foram notificados 73.253 casos, durante o surto de 2016, e 2.184 casos notificados em 2018 com redução de 97,0% no números de casos e no estado de Pernambuco foram notificados 423 casos em 2016, e 109 casos em 2018 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017). A partir do território brasileiro, o ZIKV disseminou-se pela América Latina e pelo Caribe atingindo mais de 20 países, entre eles: Colômbia, El Salvador, Guatemala, México, Panamá e Venezuela (BOGOCH *et al.*, 2016; YAKOB; WALKER, 2016).

Figura 3- Casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016, 2017 e 2018

Fonte: Ministério da Saúde Secretária de Vigilância em Saúde, (2018)

No que concerne aos casos de microcefalia associados ao zika, em outubro de 2015 foi observado um aumento no número de casos de microcefalia em recém nascidos no Brasil, principalmente, no estado de Pernambuco quando comparado com os últimos anos. Antes do surto de ZIKV, foram registrados em média 150-200 casos de microcefalia por ano no país entre 2010-2014 (CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2016). Divergindo da média já conhecida, em novembro de 2015 foi observado um aumento de quase dez vezes nos casos de suspeita de microcefalia (**Figura 4**), sendo notificados no total 1.248 casos suspeitos em 14 estados do território nacional. Pernambuco foi o estado que apresentou o maior número de casos: 646 confirmados, seguido pelo estado da Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Alagoas, Bahia, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Tocantins, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul (CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2016; HEUKELBACH *et al.*, 2016).

Figura 4- Casos notificados de microcefalia ZIKV por região do Brasil, até abril de 2016

Fonte: Lowe *et al.* (2018, tradução nossa)

Diante desse cenário de disseminação do ZIKV, foi observado um aumento inesperado nos casos da SGB em diversos países como Brasil, Venezuela, El Salvador, França e Nova Zelândia (CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2016). Durante o surto na Polinésia Francesa, entre outubro de 2013 e abril de 2014, já tinha sido observado um aumento de quase 20 vezes na incidência de casos de SGB (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Em um estudo de caso controle, Cao-Lormeau *et al.*, 2016, demonstraram forte associação entre infecção pelo zika e o aumento de SGB, dos pacientes portadores da síndrome, 98% apresentaram IgM ou IgG contra o ZIKV (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Segundo a OMS, somente no Brasil foram registrados 1.708 casos, indicando um aumento de 19% nos casos desde 2014, sendo Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Piauí, Espírito Santo e Rio de Janeiro os estados que apresentaram aumentos no número de casos.

2.3 Estrutura e Genoma Viral

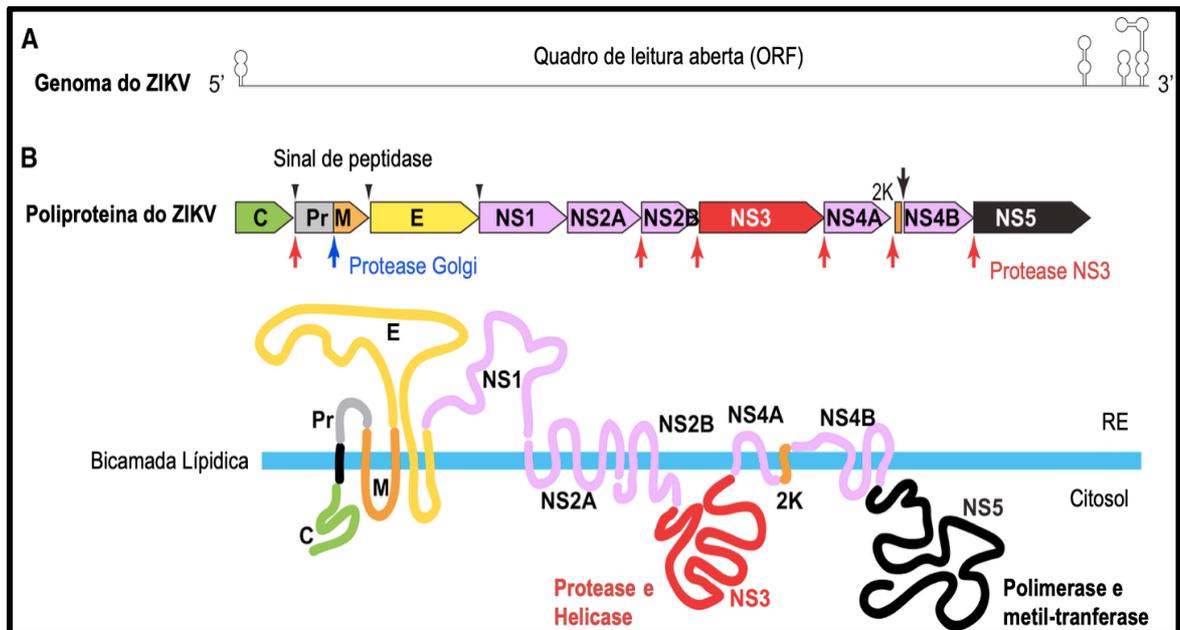
O ZIKV é classificado como um flavivírus e portanto, assim como os demais membros da família *Flaviviridae* é um vírus icosaédrico, com envelope lipídico e com uma molécula de RNA em fita única (**Figura 6**), não segmentada, com sentido

positivo que codifica todas as proteínas virais a partir de uma única *Open Reading Frame* (ORF) (**Figura 5**) (MEDIN; ROTHMAN, 2017). O genoma é empacotado com múltiplas cópias da proteína C viral dentro de uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, cercada por 180 cópias da proteína E e das glicoproteínas da M (HASAN *et al.*, 2018). O vírion é esférico e em sua forma madura o apresenta ~ 500Å de diâmetro e quando imaturo aproximadamente 600Å (HASAN *et al.*, 2018).

O RNA genômico tem aproximadamente 11kb de comprimento e a ORF é flanqueada nas extremidades 5' e 3' por regiões não codificantes (UTR) importantes para o processo de tradução e replicação do RNA viral, assim como, interações entre proteínas virais-hospedeiro (LINDENBACH; RICE, 2003). A extremidade 5' apresenta uma estrutura cap do tipo I que auxilia na tradução do RNA e nos mecanismos de evasão do sistema imunológico (MEDIN; ROTHMAN, 2017). A ORF codifica uma poliproteína precursora com tamanho de 3.423 aminoácidos que será clivada, em processo pós-traducional, por proteases virais e do hospedeiros em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (KONG *et al.*, 2018).

As três proteínas estruturais juntas são necessárias para a formação dos vírions infecciosos e são divididas em: proteína C, proteína pequena que forma um homodímero estável com 4 domínios α -hélice que se ligam ao RNA viral para empacotar e formar o nucleocapsídeo (KONG *et al.*, 2018; MEDIN; ROTHMAN, 2017). A prM que sofre clivagem para formar a proteína M durante a maturação das partículas, esse novo fragmento formado é inacessível à ligação com anticorpos dificultando assim ação do sistema imunológico. A proteína E é a maior proteína estrutural e contém regiões de reconhecimento de receptores celulares específicos para ligação e entrada do vírus na célula hospedeira, além disso, essa proteína é considerada como o principal sítio antigênico do vírus (KONG *et al.*, 2018; LINDENBACH; RICE, 2003; MEDIN; ROTHMAN, 2017).

Figura 5- Genoma e proteínas do ZIKV



Fonte: Ming *et al.* (2016, tradução nossa)

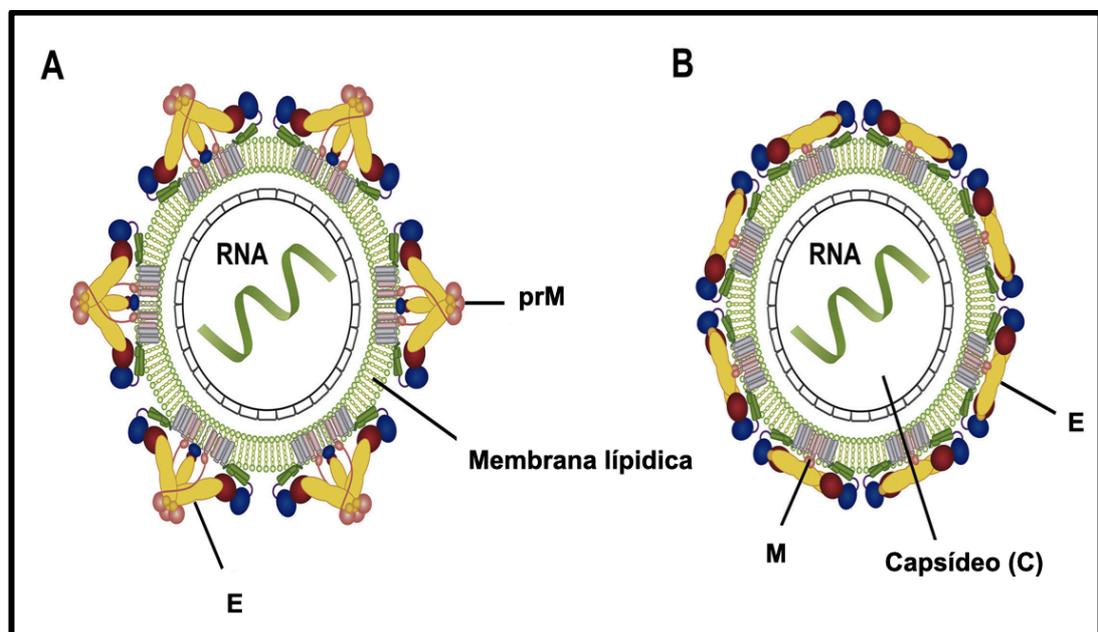
As proteínas não estruturais (NS), como o próprio nome já sugere, não participam da parte estrutural do vírus, mas desempenham múltiplas funções na replicação, montagem da partícula viral, síntese de RNA e evasão do sistema imune. No total são sete proteínas, divididas em NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (MEDIN; ROTHMAN, 2017).

A proteína NS1 quando glicosilada forma um homodímero dentro das células que participa da replicação viral e posteriormente na infecção tardia. Uma vez clivada da poliproteína é fundamental na formação do complexo de replicação no recrutamento de outras proteínas não estruturais para a montagem das partículas virais (RASTOGI *et al.*, 2016). Quando excretada no espaço extracelular, na forma de lipoproteína, participa na evasão imunológica interagindo com componentes da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (SONG *et al.*, 2016), antagonizando a função do sistema complemento e interagindo com macrófagos e células dendríticas inibindo a transdução do sinal proveniente do receptor TLR3 (WANG *et al.*, 2018). A função das proteínas NS2 não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que a NS2A, proteína hidrofóbica, está envolvida no processo de replicação do RNA, por ser uma proteína constituinte do complexo de replicação do RNA viral além de auxiliar na evasão do sistema imune por antagonizar a resposta antiviral dependente de interferon (YOON *et al.*, 2018) enquanto que a NS2B, proteína transmembrana com domínio hidrofóbico, interage com a porção C-terminal da NS3 atuando como cofator

da mesma (HASAN *et al.*, 2018). A NS3 é principal proteína viral que ao ser ativada participa do complexo de replicação viral uma vez que contém domínios de helicase, hidrolase e RNA-trifosfatase (BAEZ *et al.*, 2017; SONG. *et al.*, 2016). As proteínas NS4A e NS4B atuam também na formação do complexo de replicação viral e na evasão do sistema imune. Em um recente estudo *in vitro*, Liang *et al.* (2016), demonstraram que ambas as proteínas (NS4A e NS4B) inibem o crescimento de células progenitoras neurais, impedindo assim o desenvolvimento normal do cérebro (LIANG *et al.*, 2016).

Por fim, a NS5 é a maior proteína sendo altamente conservada e consiste em duas subunidades com funções distintas. O primeiro domínio da extremidade N-terminal ou metiltransferase (MTase) está envolvido na formação da estrutura do 5' capping. Já a segunda subunidade, C-terminal, tem atividade de RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) responsável pela síntese de novas moléculas de RNA (BAEZ *et al.*, 2017; HASAN *et al.*, 2018; LINDENBACH; RICE, 2003).

Figura 6- Estrutura da partícula viral do ZIKV



Fonte: Agreli *et al.* (2019, tradução nossa)

Legenda. **A-** Partícula imatura exibindo projeções triméricas de (prM-E)₃; **B-** Partícula madura exibindo homodímeros de E (E)₂ e M (M)₂ após clivagem pela enzima furina.

Diversos estudos recentes analisaram, por meio de crio-microscopia eletrônica, as diferenças estruturais entre as formas imatura e madura do ZIKV (PRASAD *et al.*, 2017; SIROHI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2003). O vírus em sua forma imatura apresenta 60 *spikes* triméricos das proteínas prM-E aumentado, dessa forma, o

diâmetro externo da partícula. Os três *spikes* cobrem os peptídeos de fusão localizados na extremidade final da proteína E que quando em um microambiente com pH baixo, sofrem rearranjo das proteínas E seguido da clivagem da prM para formar o vírion maduro. Nesta mudança conformacional, os 60 trímeros da proteína E se reorganizam em 90 dímeros formando a superfície lisa do vírus maduro (HASAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2003, 2004;).

2.4 Ciclo de Replicação

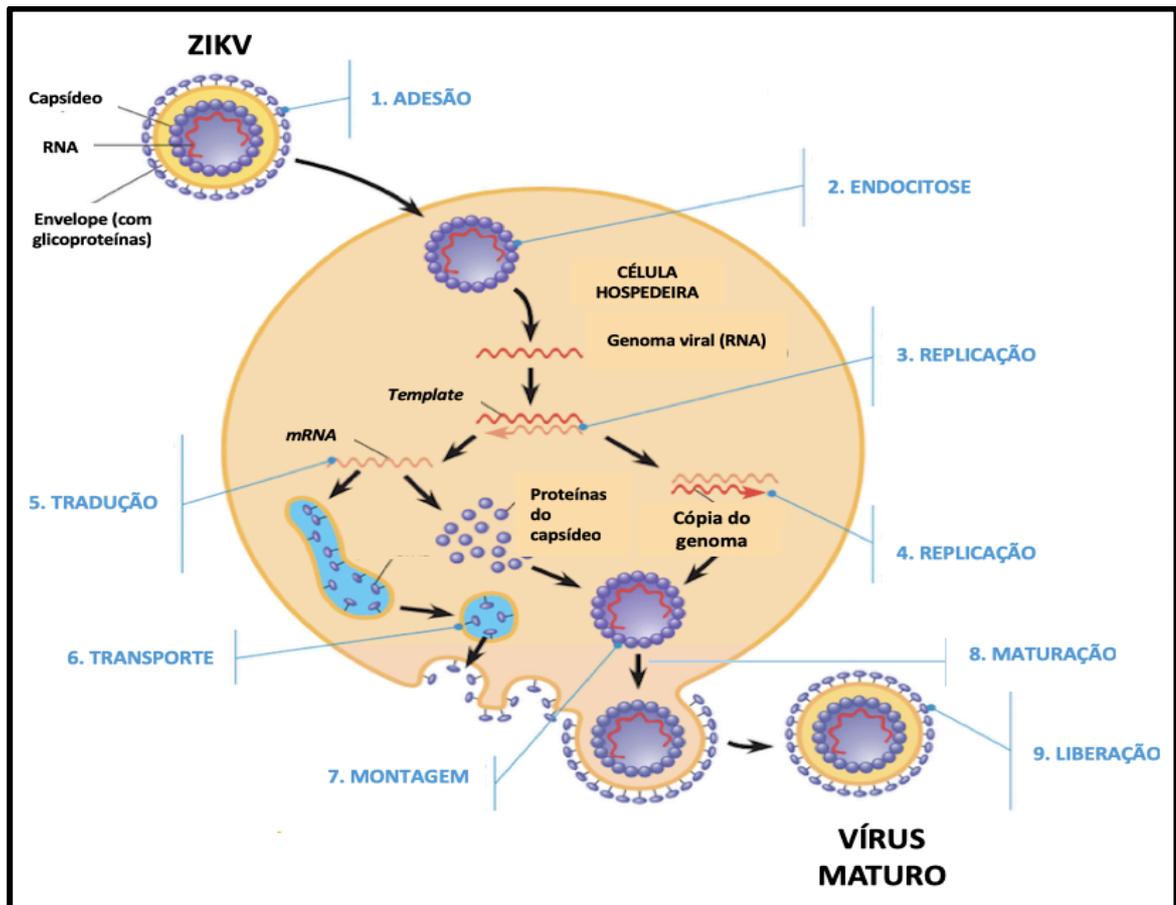
Assim como os outros flavivírus a infecção pelo ZIKV se inicia com a entrada do RNA viral no citoplasma da célula-alvo após a fusão do envelope viral com as membranas celulares. No interior da célula, o RNA será replicado, empacotado dentro das proteínas estruturais até ser liberado em sua forma madura. O ZIKV pode infectar um amplo espectro de células de diferentes tipos teciduais, como células do intestino médio e glândula salivar de mosquitos *Aedes* e também culturas *in vitro* de células de mosquitos (C6/36) (HAMEL *et al.*, 2015). Além dos modelos já citados, o vírus tem a capacidade de infectar e se replicar em uma extensa variedade de células de mamíferos. Estudos demonstraram que o vírus é capaz de se replicar em células cerebrais, incluindo neurônios (BELL *et al.*, 1971); células de rim de macacos (células Vero) (WAY *et al.*, 1976), células da derme humana e células dendríticas imaturas (HAMEL *et al.*, 2015).

O ZIKV entra na célula via endocitose mediada por receptores específicos, principalmente, os receptores da família fosfatidilserina: DG-SIGN, TIM (TIM-1 TIM-4) e TAM (AXL ou Tyro3) (HAMEL *et al.*, 2015). Após a internalização, o vírus é transportado até o endossomo, onde ao encontrar um ambiente com pH ácido é estimulado a sofrer mudanças conformacionais na estrutura da proteína E levando à fusão das membranas virais e endossomais liberando seu material genético no citoplasma da célula (SAIZ *et al.*, 2016). Após ser liberado, o RNA atua como mRNA e direciona a síntese da poliproteína no retículo endoplasmático, molécula que será clivada, em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais, por proteases virais e do hospedeiro (YUN; LEE, 2017). Após a tradução a fita de RNA com sentido positivo serve de modelo para a síntese da molécula complementar de RNA com polaridade negativa (3'-5') que irá atuar como molde para a síntese de novas moléculas de RNA genômico. O material genético recém sintetizado irá fazer parte

do nucleocapsídeo, portanto, precisa ser empacotado na progênie viral que irá brotar do retículo endoplasmático para formar o envelope das partículas imaturas (YUN; LEE, 2017).

A maturação das partículas virais ocorre no citoplasma das células infectadas. Na sua conformação inicial os vírions imaturos contêm uma membrana lípídica em associação com as proteínas prM e E dispostas em forma icosaédrica na superfície do vírus. As proteínas prM e E são liberadas do lumen do retículo endoplasmático (RE) durante a tradução e processamento da poliproteína viral. A proteína C interage com o RNA viral e inicia a formação do nucleocapsídeo, enquanto isso a prM interage com a proteína C levando ao brotamento do vírion imaturo no lúmen do RE. Esse continua em sua forma imatura até encontrar um microambiente ácido, a diminuição do pH induz a clivagem da prM pela protease furina do hospedeiro, causando uma reorganização nos dímeros da proteína E levando a sua conformação madura. Somente então, o vírion maduro é liberado utilizando a maquinaria secretora da célula infectada (**Figura 7**) (HASAN *et al.*, 2018; MEDIN; ROTHMAN, 2017; SAIZ *et al.*, 2016; YUN; LEE, 2017).

Figura 7- Ciclo replicativo do ZIKV



Fonte: Song *et al.* (2017, tradução nossa).

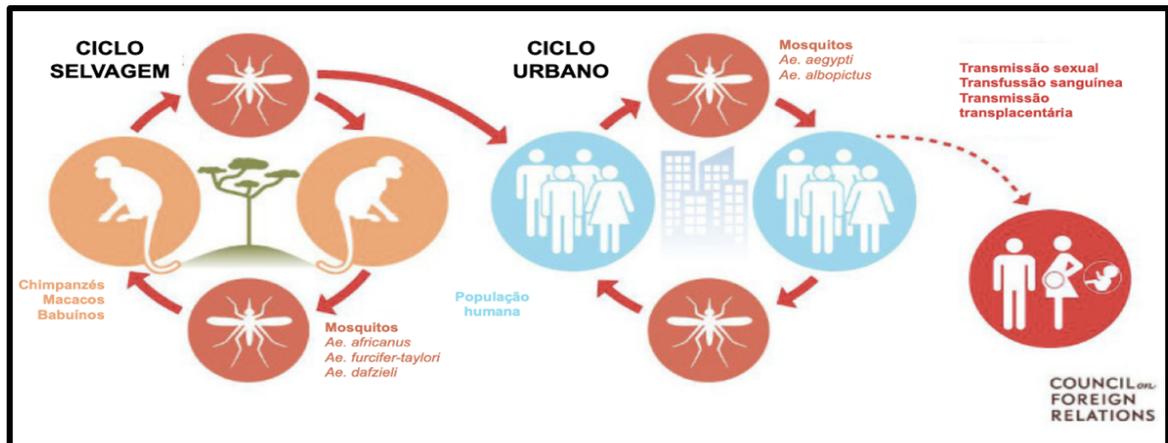
2.5 Transmissão

Desde sua descoberta, em 1947, acreditava-se que por se tratar de um arbovírus o ZIKV seria transmitido somente pela picada de mosquitos vetores *Aedes spp.* Entretanto, estudos recentes descobriram outras rotas de transmissão do ZIKV, incluindo entre elas, transmissão sexual, por meio da transfusão de sangue e transplante de órgãos, transplacentária e perinatal (BASILE *et al.*, 2017; SHARMA; LAL, 2017). Estudos já confirmaram a presença do RNA e/ou proteína viral em diversos fluídos biológicos, como: sêmen, urina, saliva, fluido amniótico, placenta (GOURINAT *et al.*, 2015; MUSSO, *et al.*, 2015; NORONHA, *et al.*, 2016). Essas vias alternativas abrem uma possibilidade para a transmissão de pessoa-a-pessoa e junto com o com a transmissão vetorial contribuem para a aparecimentos dos últimos surtos de ZIKV.

O vírus apresenta duas forma de transmissão, uma selvagem e outra urbana (Figura 8). Originalmente o vírus era transmitido somente no ciclo selvagem

envolvendo, principalmente, primatas não humanos e o vetor invertebrado (mosquito) e o seres humanos como hospedeiros secundários em poucos casos (BASILE *et al.*, 2017; ZANLUCA *et al.*, 2016;). A adaptação do vírus ao ambiente urbano originou a segunda forma do ciclo, envolvendo os seres humanos na função de hospedeiro principal e os mosquitos domésticos como vetores e juntos mantém a circulação ativa do ZIKV em regiões urbanas/peri-urbanas (MUSSO; GUBLER, 2016; VOROU, 2016).

Figura 8- Ciclo selvagem e urbano do ZIKV



Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2016, tradução nossa)

2.5.1 Transmissão Vetorial

O mecanismo primário de transmissão do vírus é via picada de fêmeas de mosquitos *Aedes* durante o momento do repasto sanguíneo. Várias espécies já foram identificadas como possíveis vetores do ZIKV, incluindo o *Aedes africanus* (primeira espécie no qual o vírus foi isolado em 1948), *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e mais 15 espécies de mosquitos do gênero *Aedes*. Entretanto, o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são considerados os principais vetores do vírus, em especial, nos ambientes urbanos e suburbanos. Ambas as espécies são vetores invasivos em muitas regiões do mundo, inclusive no Brasil e estão intimamente associadas ao ambiente peridoméstico, contribuindo assim para a manutenção do ciclo urbano (LOWE *et al.*, 2018).

O envolvimento de diversas espécies de mosquitos na manutenção do ZIKV reflete a complexidade da transmissão do vírus e, também, a sua alta capacidade de adaptação a novos ambientes e vetores. O simples isolamento do vírus em amostra de mosquito não é evidência suficiente para comprovar que aquela espécie em

questão é um vetor viral, para tal, são necessários estudos para comprovar a capacidade de transmissão do vírus (MUSSO; GUBLER, 2016). Diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de estudar possíveis vetores do ZIKV, Ayres 2016 detectaram a presença do genoma do vírus em dez espécies de *Aedes*, assim como em *Mansonia uniformis*, *Anopheles coustani* e *Culex perfuscus* (AYRES, 2016). Em outro estudo, realizado no Brasil, Guedes et al. 2017, detectaram a presença do vírus em amostras do intestino médio, glândula salivar e saliva em fêmeas de *Culex quinquefasciatus* (GUEDES *et al.*, 2017). Esses dados fortalecem a hipótese de que outras espécies estão envolvidas na transmissão do ZIKV e que estratégias de controle dos vetores devem ser direcionadas para todos os vetores em potencial.

2.5.2 Transmissão Não-vetorial

Além da transmissão vetorial, já bem documentada na comunidade científica, outras formas de transmissão do vírus já foram relatadas na literatura como: transmissão vertical, sexual e por transfusão de sangue.

A transmissão vertical do ZIKV representa um grande desafio para órgãos de saúde pública e para os cientistas de modo em geral e já foram relatados essa transmissão para outros flavivirus como DENV e vírus do Oeste do Nilo (WNV) (FIKIRIG *et al.*, 2017). Provavelmente essa via está diretamente relacionada com os casos de Síndrome Congênita do Zika (SCZ) e má formações cerebrais observadas em recém nascidos (SHARMA; LAL, 2017). A transmissão mãe-filho pode ocorrer de duas maneiras: a primeira, a forma perinatal acontece no momento do nascimento ou durante o período de aleitamento materno (BASILE *et al.*, 2017). Na segunda, a via transplacentária, o vírus cruza a barreira hematoencefálica e é capaz de infectar e se replicar nas células do feto. Miner *et al.*, 2016, conduziram um estudo usando camundongos como animais modelos e concluíram que durante a gravidez a infecção por ZIKV resulta em danos à placenta e possível morte do feto, confirmando assim a rota de transmissão transplacentária (MINER *et al.*, 2017).

A transmissão sexual do ZIKV contribui ativamente para a disseminação do vírus e, conseqüentemente, para o aumento no números de casos, pois representa uma nova via de transmissão em áreas livres da presença dos mosquitos vetores competentes (HASTINGS; FIKRIG, 2017). Um antigo dogma na literatura, era que flavivírus como o ZIKV precisavam de um vetor para serem transmitido de uma pessoa

a outra, até fevereiro de 2016 três casos foram relatados por serem transmitidos sexualmente (SAIZ *et al.*, 2016).

Atualmente, já foram relatados casos de transmissão homem-mulher, forma mais comum, mulher-homem e homem-homem (BEUTNER *et al.*, 2016; HASTINGS; FIKRIG, 2017). O sexo vaginal é a principal via de transmissão sexual, mas foram relatados casos em que a transmissão viral ocorreu por sexo oral e anal (MOREIRA *et al.*, 2017). A grande problemática em relação a essa via de transmissão, é que o ZIKV pode persistir por longos períodos nas secreções masculinas, como consequência, o vírus poderia ser transmitido mesmo após o fim da infecção viral (NICASTRI *et al.*, 2016). Além disso, os pacientes assintomáticos representam um grande desafio na disseminação ativa do vírus, pois poderiam aumentar o risco da transmissão ativa (MOREIRA *et al.*, 2017).

A transmissão transfusional do ZIKV deve ser levada em consideração, pois casos de outros arbovírus como, DENV, vírus chikungunya (CHKV) e WNV, transmitidos por sangue já foram documentados na literatura (MUSSO; GUBLER, 2016).

2.6 Sinais e Sintomas Clínicos

O quadro clínico da infecção, de modo geral, é moderado com a evolução auto limitante, sendo os sintomas muitas vezes confundidos com uma gripe comum ou mesmo outras arboviroses. Os sintomas mais comuns envolvem: febre de intensidade baixa ou moderada, cefaléia, mal-estar, artrite ou artralgia, conjuntivite não purulenta, erupção cutânea e em menos frequência dor retro orbital, mialgia e vômito (**Figura 9**) (MUSSO, 2015; 2016; SONG *et al.*, 2017). O período de incubação do vírus é, em média, dez dias e após o surgimento dos primeiro sintomas estes tendem a desaparecer espontaneamente dentro de sete dias, mas em alguns casos a artralgia pode persistir em até um mês (SAIZ *et al.*, 2016). Aproximadamente 80% dos casos se manifestam na forma assintomática da infecção, porém em alguns casos podem ocorrer manifestações severas incluindo complicações neurológicas (SGB e meningoencefalite) e autoimunes (trombocitopenia e leucopenia) e casos graves de microcefalia, má formação fetal e lesões óticas (**Figura 9**) (BASILE; KOK; DWYER, 2017; ZANLUCA *et al.*, 2016;). Em pacientes imunossuprimidos pode apresentar complicações viscerais graves e, em alguns casos, complicações fatais. Crianças

também representam um quadro peculiar, podendo apresentar quadro cutâneo atípico e podem apresentar quadros de recorrência da infecção sob determinados fatores precipitantes, como o estresse (LUZ *et al.*, 2015).

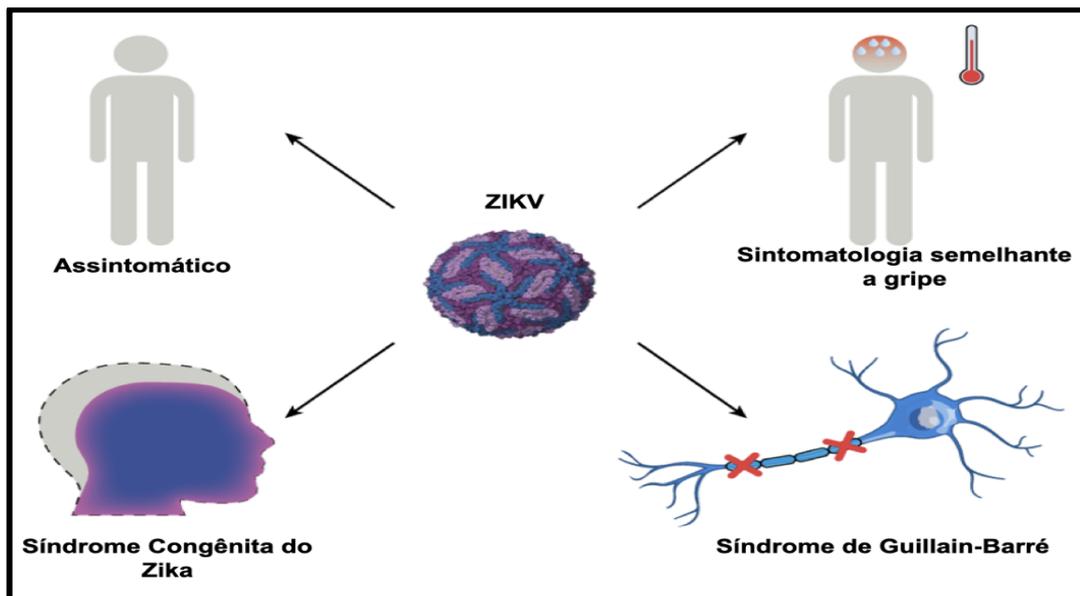
A possibilidade dos aumentos no números de casos de microcefalia estar relacionada com a epidemia de ZIKV, em 2015, no Brasil levantou o interesse das autoridades de saúde do país. Durante o surto brasileiro, a incidência de casos de microcefalia aumentou consideravelmente, com mais de 4.000 casos suspeitos e 907 casos confirmados (MIRANDA-FILHO, *et al.*, 2016; EICKMANN *et al.*, 2016). A relação entre a presença do vírus e a complicação neurológica foi comprovada quando, após análises, o RNA viral foi detectado em amostras do líquido amniótico de mulheres que deram a luz a recém nascidos com microcefalia e também nas amostras de tecido cerebral dos neonatos (HILLER *et al.*, 2015).

Os exames clínicos feitos nos neonatos, em 2015, mostraram que os resultados eram diferentes dos casos de microcefalia causados por outros agentes infecciosos com intensa calcificação intracranial e anormalidades neurológicas (BARROS MIRANDA-FILHO, *et al.*, 2016). Os exames físicos dos recém-nascidos com infecção congênita pelo ZIKV apresentaram também desproporção craniofacial, fontanelas fechadas, protuberância óssea occipital, além de, irritabilidade, choro excessivo, hiper-reflexia e hiperexcitabilidade (EICKMANN *et al.*, 2016). A correlação entre a infecção por ZIKV e os casos de microcefalia ainda estão sob investigação, sobretudo os mecanismos patogênicos que levam à má-formação neurológica. Devhare *et al.* (2017), conduziram estudos *in vitro* e observaram que o ZIKV inibe o crescimento de células troncos neuronais além de induzir fortemente a morte celular e a diferenciação de células neuroprogenitoras, indicando uma das possíveis vias para a causa da desordem neurológica em recém nascidos.

As complicações oftalmológicas decorrentes da infecção por ZIKV ainda não foram totalmente estabelecidas, mas de acordo com a literatura, casos de infecção por ZIKV no período gestacional podem estar relacionado com o comprometimento ocular dos recém nascidos (MIRANDA *et al.*, 2016). As primeiras observações foram relatadas por Ventura *et al.* (2016), em um estudo com três crianças com microcefalia nascidas após o surto de ZIKV no Brasil, detectaram que todas as crianças apresentaram exacerbada pigmentação macular e perda do reflexo da fóvea (VENTURA *et al.*, 2016).

A síndrome de Guillain-Barré é uma doença auto imune, no qual, o sistema imune ataca parcialmente o sistema nervoso periférico causando formigamento dos membros, sensação de perda do reflexo das pernas e o/ou braços, fraqueza muscular, paralisia e até mesmo a morte em alguns casos (CRÉANGE, 2016). Em 2015, durante o surto no Brasil, também foi observado um aumento de 19% na incidência de casos de SGB quando comparado com o ano de 2014 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Os pacientes apresentam sintomas clínicos neurológicos, em média, após o sexto dia da infecção por ZIKV com rápida progressão da doença desenvolvendo fraqueza generalizada, perda dos reflexos e habilidade motora e nos casos mais graves paralisia dos músculos respiratórios exigindo acompanhamento hospitalar (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016).

Figura 9- Sinais clínicos da infecção pelo ZIKV



Fonte: Pierson, Diamond (2018, tradução nossa)

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico do ZIKV é de suma importância para o encaminhamento de monitoração e tratamento dos possíveis casos assintomáticos para os registros adequados dos dados epidemiológicos repassados às autoridades de saúde pública. O diagnóstico de flavivírus, de modo geral, se baseia na detecção direta do vírus ou na detecção de anticorpos gerados contra a infecção viral (BASILE *et al.*, 2017). Como os sintomas da infecção por ZIKV são semelhantes aos de algumas outras infecções

arbovirais, é difícil distinguir com segurança a infecção por ZIKV dos outros arbovírus baseados somente pelos sinais clínicos. O diagnóstico ideal envolve a anamnese e critérios epidemiológicos e/ou clínicos do paciente, tais como: morar ou ter viajado para áreas com transmissão ativa do ZIKV, apresentar ou não sintomas clínicos característicos da infecção por ZIKV. Atualmente, os dois métodos mais comuns utilizados na rotina para o diagnóstico na infecção por ZIKV se baseia em métodos sorológicos e moleculares.

O diagnóstico sorológico do ZIKV é realizado por meio do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), o qual detecta a presença de anticorpos IgM ou IgG a partir do 5º ou 6º dia após o aparecimento dos sinais clínicos (ZANLUCA *et al.*, 2016). Os anticorpos IgM contra os antígenos do flavivírus são produzidos pela primeira vez 4 a 7 dias após a infecção enquanto que os anticorpos IgG aparecem mais tarde no decorrer da infecção. O grande fator determinante referente a esse método é a possibilidade de reação cruzada com outros flavivírus, podendo gerar resultados falsos positivos. Essa reação acontece devido à similaridade do ZIKV com outros flavivírus como DENV, YFV, WNV, e também devido à co-circulação desses mesmo vírus nas regiões endêmicas de ZIKV (SHARMA; LAL, 2017).

Os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade para os indivíduos que não tiveram contato prévio com nenhum flavivírus, porém em pacientes com histórico de outra infecção por flavivírus a interpretação dos resultados pode ser comprometida gerando resultados inconclusivos ou falsos positivos (MUSSO *et al.*, 2016; SAIZ *et al.*, 2016). Portanto, os resultados sorológicos devem ser cuidadosamente interpretados em relação ao histórico clínico do paciente, para minimizar possíveis erros de interpretação.

O método de diagnóstico molecular consiste na detecção do RNA viral por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR) em amostras de soro e/ou urina. O RT-PCR permite uma detecção de RNA viral de forma rápida, específica e confiável durante a fase aguda, em comparação com outros modos de detecção (SHARMA; LAL, 2017). No entanto, como o período virêmico é curto, a detecção direta do vírus deve ser realizada em amostras realizadas nos primeiros 3-5 dias após o início dos sintomas (SAIZ *et al.*, 2016). Os testes moleculares têm como vantagem alta sensibilidade e alta especificidade, mesmo no casos de indivíduos que apresentaram histórico de infecção por outros flavivírus, diminuindo assim a possibilidade de resultados falsos negativos decorrentes da

reação cruzada com outros vírus. Na detecção do RNA do ZIKV os genes do envelope (regiões codificantes da proteína prM/E) são direcionados para amplificação devido às suas características únicas que permitem a diferenciação de outros flavivírus (MARANO *et al.*, 2016). As desvantagens do testes incluem o custo elevado para realização do exame e o curto período de detecção do genoma viral comprometendo, dessa maneira, o diagnóstico dos pacientes assintomáticos. (MUSSO; GUBLER, 2016).

Outros testes disponíveis incluem o Teste de Neutralização por Redução em Placa (PRNT), técnica utilizada para a quantificação do título de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus, ou o teste de isolamento viral usando cultura de células, de mosquito ou mamíferos, para detectar partículas virais infecciosas. Devido ao alto custo e a complexidade essas técnicas são realizadas somente em centros de referência em diagnóstico e em laboratórios de pesquisa (MUSSO; GUBLER, 2016; SAIZ *et al.*, 2016; ZANLUCA; SANTOS, 2016).

2.8 Tratamento

Atualmente, não há nenhuma vacina ou fármacos antivirais específicos para para o ZIKV, o tratamento consiste em aliviar os sintomas com medicamentos analgésicos, anti-piréticos e, em alguns casos, anti-inflamatórios para aliviar as dores decorrentes da artrite (BASILE *et al.*, 2017). O uso de dipirona ou acetaminofen (paracetamol) é recomendado no monitoramento da febre e da dor e nos casos de coceira medicamentos anti-histamínicos devem ser utilizados (ZANLUCA *et al.*, 2016).

No âmbito das vacinas, diversas plataformas vacinais contra flavivírus foram produzidas nos últimos anos, usando distintas estratégias como: vírus atenuado ou inativado, proteínas recombinantes ou DNA recombinante, portanto, as mesmas estratégias podem ser utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV. Recentemente, Larocca *et al.* (2016), demonstraram que uma única dose de vacina de DNA visando os antígenos prM e E era capaz de proteger camundongos quando desafiados com o ZIKV (LAROCCA *et al.*, 2016). Posteriormente, um estudo em macacos *rhesus* encontrou três plataformas vacinais diferentes (vírus inativado, DNA recombinante e vacina com vetor baseado em adenovírus) forneceu proteção completa contra o desafio com ZIKV, entretanto, a vacina de vírus inativado se mostrou mais eficaz potente que a vacina de DNA (ABBINK *et al.*, 2016). Atualmente,

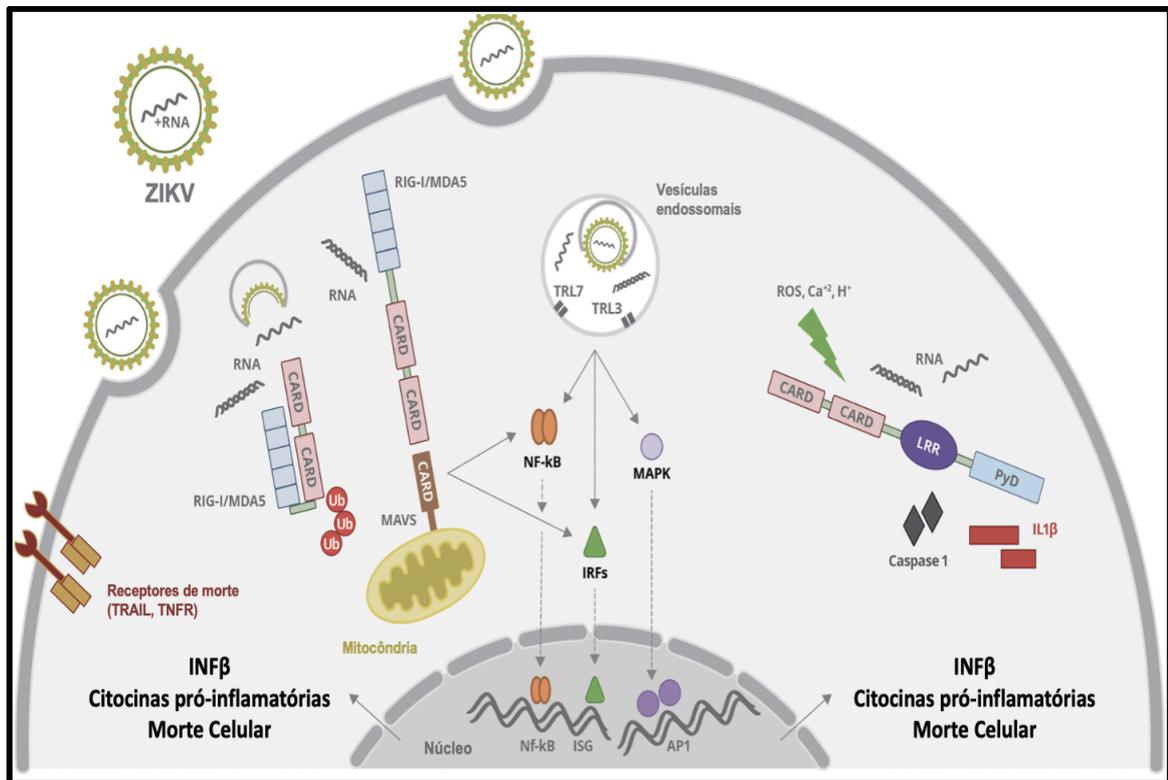
quatro candidatos vacinais chegaram à fase de ensaio clínico 1 e se mostraram seguros para a pequena amostra de voluntário dos estudos (BARRET *et al.*, 2018; GUADINSKI *et al.*, 2018; TEBAS *et al.*, 2017), esse dados sugerem que esses candidatos podem avançar para a fase de ensaio clínico 2. Apesar dos resultados, mais estudo devem ser realizados para comprovar a eficácia e segurança desses possíveis candidatos à uma nova vacina.

2.9 Resposta imune frente à infecção pelo ZIKV

A ativação da resposta imune inata ocorre pela interação dos receptores celulares, receptores de reconhecimento de patógenos (PRR), com moléculas expressas ou sintetizadas pelo vírus durante a replicação conhecida como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A ativação dos PRRs levará a uma resposta pró-inflamatória para tentar controlar a replicação viral antes da resposta imune adaptativa (LERAT *et al.*, 2017).

A resposta imune inata dependente do IFN é essencial para proteção contra infecções por flavivírus, o IFN do tipo I e II inibem a infecção por flavivírus em cultura celular e em animais. O IFN I (α ou β) bloqueia a infecção por flavivírus prevenindo tradução e replicação de RNA viral infeccioso, enquanto o IFN II (IFN- γ) inibe a replicação viral por estimular a síntese de moléculas pró-inflamatórias e antivirais (DIAMOND, 2003). A via de sinalização do IFN é ativada pelo reconhecimento do genoma viral pelo receptores semelhantes a *toll* (TLR), receptores expressos na membrana celular ou nos endossomos, e pelos receptores citosólicos RIG-1 e MDA5 (LERAT *et al.*, 2017). Durante a infecção pelo ZIKV, o TLR 3 foi identificado como o receptor endossomal que reconhece o RNA de fita dupla de RNA do vírus (dsRNA), enquanto os receptores TLR 7 e TLR 8 estão envolvidos no reconhecimento da molécula de fita simples de RNA (ssRNA) (SUTHAR *et al.*, 2013). Esses receptores ao interagirem com os PAMPs do vírus ativam os fatores de transcrição IRF3, IRF7 e NF- κ B que desencadeiam na produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e de IFN I e III (LESTER; LI, 2013). O IFN I ao interagir com os receptores IFNR1 dá início a via de indução do IFN I que, conseqüentemente, ativa a via do JAK/STAT responsável pela transcrição de mais de 300 ISG, estes, codificam proteínas que induzem o estado antiviral e auxiliam a eliminar a infecção (**Figura 10**) (FLEMING, 2016; KUMAR *et al.*, 2016).

Figura 10- Resposta imune inata em células infectadas pelo ZIKV



Fonte: Arruda *et al.* (2016, tradução nossa)

O inflamassoma, complexo multiproteico pertencente ao sistema imune inato também auxilia no combate à infecção viral. Os receptores NLRs, em especial o NLRP3 detecta sinais de danos no ambiente celular e juntos com a ASC promovem a clivagem da Casp-1 levando à maturação e secreção do IL-1 β , esta, por sua vez desempenha papel fundamental na resposta inflamatória, estimula a resposta imune adaptativa e facilita o recrutamento de linfócitos (WANG *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2018) mostraram que a infecção pelo ZIKV ativa a formação do inflamassoma e estimula a secreção de IL-1 β , dessa forma gerando uma resposta inflamatória no combate à infecção viral.

O IFN I é um dos principais componentes imunes no combate da infecção pelo ZIKV, Lazear *et al.* (2016) demonstraram que camundongos deficientes no receptores de IFN ou camundongos *knockout* que produziam baixos níveis de IFN eram mais suscetíveis à infecção pelo ZIKV e desenvolviam complicações neurológicas e, até mesmo, em alguns casos os animais iam à óbito (LAZEAR *et al.*, 2016).

Outro componente importante na resposta antiviral é a resposta imune adaptativa que inclui células T CD4+, T CD8+ e anticorpos neutralizantes. A

importância da resposta adaptativa está bem elucidada para outros flavivírus, como o DENV, mas atualmente muito pouco ainda é conhecido sobre a resposta adaptativa na infecção pelo ZIKV. Huang *et al.* (2017), demonstraram que as células T CD8+ desempenham função protetora contra o ZIKV em camundongos imunocompetentes reduzindo, assim, a carga viral (HUANG *et al.*, 2017), além disso, a transferência adotiva dessas células levou à redução da carga viral em animais que foram desafiados com o ZIKV (NGONO *et al.*, 2018). Hassert *et al.* (2018) estudaram o papel das células T CD4+ na infecção e concluíram que essas células também apresentam papel protetor no decorrer da infecção, demonstrando que na ausência de TCD4+ os camundongos apresentavam sequelas neurológicas mais graves e aumento significativo no título viral no sistema nervoso central (HASSERT *et al.*, 2018). A resposta humoral é um componente essencial enquanto que os anticorpos neutralizantes limitam o avanço da infecção (DIAMOND, 2003). As proteínas estruturais E, prM junto com a NS1 representam os principais alvos específicos para a resposta de anticorpos. Estudos mostraram que anticorpos ZIKV específicos apresentam capacidade de controle viral em camundongos infectados (LAROCCA *et al.*, 2016).

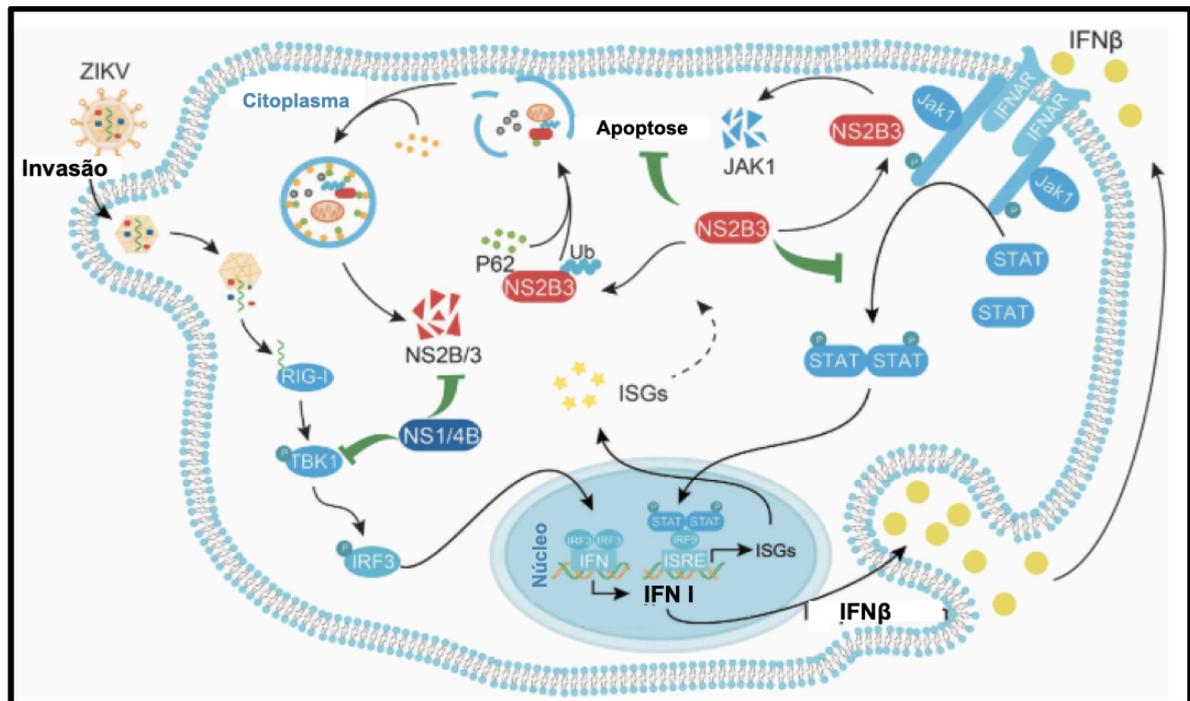
Apesar dos mecanismos eficientes do sistema imune, os vírus desenvolveram estratégias para evadir da resposta imune do hospedeiro, como: a adição do CAP pela NS5 dos flavivírus para inibir o reconhecimento do RNA viral pelos PRRs citosólicos, o uso da via de autofagia para otimizar a replicação viral, entre outros (DIAMOND, 2003). O ZIKV, por sua vez, também desenvolveu mecanismo de evasão e a maioria deles faz uso das proteínas não estruturais.

2.10 Patogênese do ZIKV

Muito pouco ainda é conhecido sobre o processo patogênico do ZIKV e muitos dados foram obtidos extrapolando o conhecimento a respeito de outros flavivírus. Durante a replicação viral, o vírus induz respostas específicas que são essenciais para garantir uma replicação e infecção viral eficientes. Devido aos últimos surtos de ZIKV, diversos estudos tentaram mostrar as mudanças celulares decorrentes da infecção pelo ZIKV e concluíram que muitas funções celulares e/ou vias de sinalização são alteradas no decorrer da infecção (GARCEZ *et al.*, 2017; ROLFE *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016; WEISBLUM *et al.*, 2017), funções essas: controle da

resposta imune inata, apoptose e morte celular, autofagia, ciclo celular e mitose, replicação e reparo do DNA, síntese e transporte de proteínas.

Semelhante a outros flavivírus, o ZIKV induz respostas antivirais no hospedeiro. Usando fibroblastos primários como modelo, Hamel *et al.* (2015), demonstraram que a expressão dos receptores RIG-I, MAD5 e TLR3 estavam up-reguladas em células infectadas (HAMEL *et al.*, 2015). Além disso, a infecção viral aumentou os níveis de expressão de IFN- α , IFN- β , ISG, CCL5, CXCL10, e da interleucina IL-1 β . Em camundongos o ZIKV antagoniza a resposta do INF, devido a ação da NS5 que promove a degradação, via proteossomo, do STAT2 (fator de transcrição que é ativado na via de sinalização do IFN-I) (MINER *et al.*, 2017). Em um estudo conduzido por Grant *et al.* (2016), os pesquisadores observaram que a super expressão da proteína NS5 inibia a produção de IFN-I por se ligar diretamente a STAT2 (BOWEN *et al.*, 2017; GRANT *et al.*, 2016). O complexo proteico NS4A e NS4B interage com a via autofágica para garantir a replicação viral e evadir do sistema imune (HAMEL *et al.*, 2015). Além disso, a proteína NS2B bloqueia a via JAK-STAT por reduzir os níveis de fosforilação da STAT1 diminuindo, conseqüentemente, a expressão dos ISG (WU *et al.*, 2017). Recentemente foi descoberto que a NS5 participa da degradação da STAT2 interferindo na via de sinalização do JAK-STAT (GRANT *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016) e Wu *et al.* (2015) confirmaram em estudos *in vitro* que a NS1 junto com a NS4B suprimem a sinalização do IFN I e que a NS2B interfere na via de sinalização do JAK-STAT por degradar a molécula de Jak1 (**Figura 11**) (WU *et al.*, 2017).

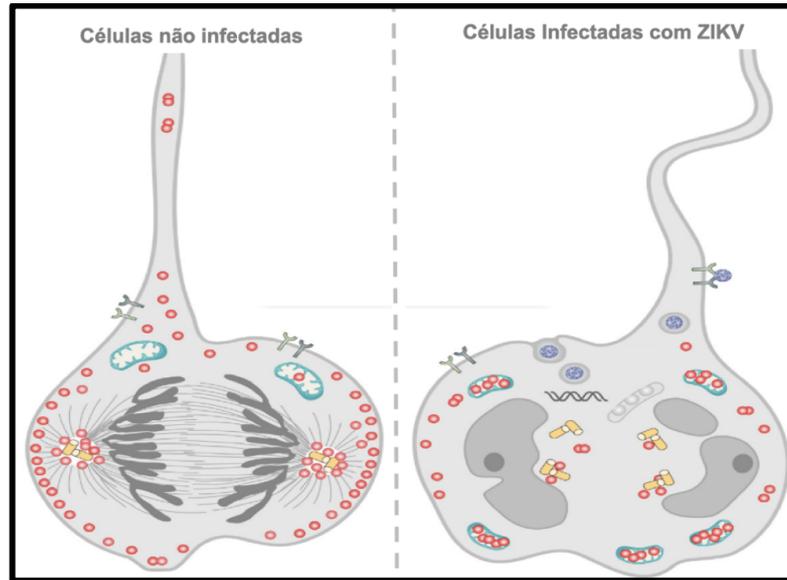
Figura 11- Antagonismo das proteínas não estruturais do ZIKV na resposta imune inata

Fonte: Wu *et al.* (2017, tradução nossa)

O objetivo de um vírus é infectar e propagar, visando maximizar esse objetivo, os vírus geralmente manipulam a via de sobrevivência celular, diante dessa premissa alguns vírus entrelaçam seus ciclos replicativos com as vias sobrevivência e morte celular, sendo a apoptose um dos processos de morte celular programada mais estudados. Estudos independentes já demonstraram que a infecção pelo ZIKV leva à morte celular, por apoptose, em células troncos neurais e células progenitoras neurais (GARCEZ *et al.*, 2017; HANNERS *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016;). Souza *et al.* (2016), após 24 horas pós infecção (h.p.i), observaram a presença de células apoptóticas com núcleo condensado e fragmentado, além de detectarem o aumento da ativação de caspase 3/7, 8 e caspase 9 (SOUZA, *et al.*, 2016). A patogênese do neurodesenvolvimento pode ser explicada pelo tropismo do ZIKV por células progenitoras neurais (TANG *et al.*, 2016) com apoptose ativada como consequência da infecção (DANG *et al.*, 2017; ONORATI *et al.*, 2016). Além de interferir com a apoptose, o ZIKV estimula também a morte celular por autofagia, processo de autodestruição da célula, no qual ocorre degradação ordenada e reciclagem dos componentes celulares. A indução da autofagia pelo ZIKV em células de fibroblasto humano foi estudada por Hamel *et al.* (2015), que verificaram, por microscopia eletrônica, a presença de autofagossomos nas células infectadas

(HAMEL *et al.* 2015). Liang *et al.* (2016), mostraram que as proteínas NS4A e NS4B são capazes de inibir a via de sinalização do Akt-mTOR induzindo a autofagia (LIANG *et al.*, 2016).

O ZIKV também causa alterações na proliferação e diferenciação celular por interferir em mecanismos de ciclo celular e mitose. Estudos iniciais mostraram que a infecção pelo ZIKV induz a hiperplasia de detritos nucleares e desregulação do ciclo celular em astrócitos e células-tronco progenitoras humanas (LI *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016). Garcez *et al.* 2017 examinaram pela primeira vez o efeito do vírus na proliferação de células troncos neurais em neuroesferas e organoides cerebrais. Os resultados mostraram que o ZIKV apresenta tropismo por células cerebrais e reduz a viabilidade e o crescimento dessas células, análises do ciclo celular revelaram anormalidades na fase G1 sugerindo que a progressão da mitose estava comprometida (GARCEZ *et al.*, 2016, 2017). Outros defeitos mitóticos já foram observados durante a infecção com o ZIKV e podem estar associados com a morte celular e a microcefalia (MARTHIENS *et al.*, 2013; THORNTON *et al.*, 2009;). Souza *et al.* (2016), usaram células neurais progenitoras para investigar a relação do ZIKV com anormalidades na divisão celular e observaram que ocorria alterações na divisão celular (SOUZA *et al.*, 2016). A quantificação de células com centrosomos extra-numerários mostrou uma desregulação dependente de MOI da replicação do centrosomo na cultura infectada pelo ZIKV. Além disso, os pesquisadores observaram alterações na mitose (**Figura 12**): divisão celular com função inadequada do aparelho mitótico levando ao atraso cromossômico e formação de micronúcleos; fusos mitóticos multipolares causando erros mitóticos que levam à perda de progênie celular; falha em uma divisão celular adequada levando ao acúmulo de aneuploidia e Outras anormalidades cromossômicas, como poliploidia, trissomia e monossomia (SOUZA *et al.*, 2016).

Figura 12- Representação esquemática das alterações do ZIKV durante a divisão celular

Fonte: Onorati *et al.* (2017, tradução nossa)

É provável que a redução induzida pelo ZIKV na proliferação e aumento da apoptose são parcialmente devidos à indução de disfunção mitótica. Estudos já mostraram que centríolos defeituosos devido ao fraco recrutamento de proteínas centrossomais são uma característica marcante da diferenciação prematura de NPCs durante a microcefalia (GABRIEL *et al.*, 2016; LANCASTER *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2014;). Gabriel *et al.* (2017) mostraram que a infecção pelo ZIKV na verdade reduziu o recrutamento centrossomal das proteínas Cep164, PCNT e CPAP (GABRIEL *et al.*, 2017) ligadas à microcefalia. Ainda, análises por microscopia eletrônica mostraram falta de apêndices em centríolos mãe e lâminas microtubulares em suas extremidades distais, dando origem a múltiplas estruturas centrossomais durante a mitose (GABRIEL *et al.*, 2017). Este efeito da infecção por ZIKV nas estruturas centrossomais se assemelha àquelas em células derivadas de pacientes com microcefalia como resultado de defeito genético (GABRIEL *et al.*, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2012; KALAY *et al.*, 2011; LANCASTER *et al.*, 2013). Além disso, organóides infectados pelo ZIKV apresentaram um plano de divisão alterado dos progenitores apicais mitóticos (GABRIEL *et al.*, 2016). Em comparação com organóides não infectados, a infecção por ZIKV levou a um aumento das frequências de progenitores mitóticos orientados verticalmente, sugerindo uma mudança não programada do plano de divisão celular.

Onorati *et al.* (2016) estabeleceram células do tronco neuroepitelial (NES) como um modelo para estudar o neurodesenvolvimento humano e a microcefalia induzida

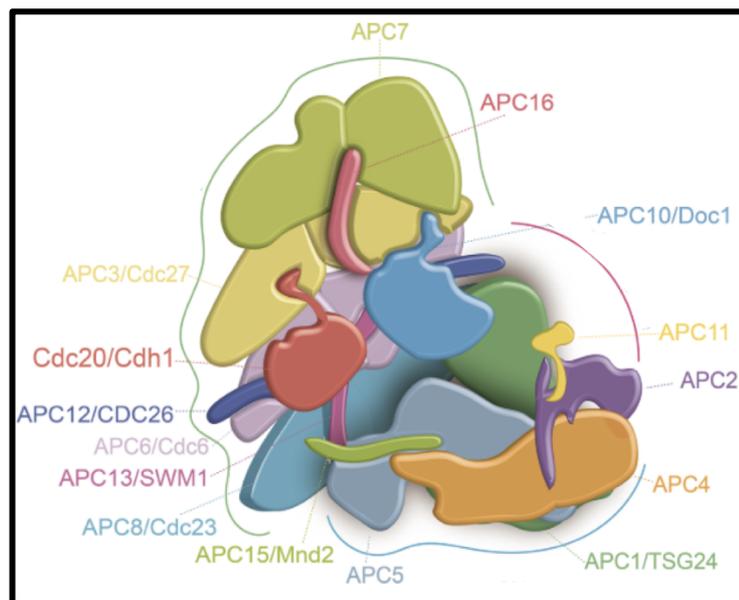
pelo ZIKV (ONORATI *et al.*, 2016). Neste estudo, o vírus ZIKV foi capaz de infectar eficientemente essas células humanas, mas não neurônios derivados de NES. A infecção por ZIKV causou a realocação da quinase 1 de ligação ao TANK fosforilada (pTBK1) dos centrossomas mitóticos para as mitocôndrias, resultando no rompimento da mitose e na indução da morte celular (ONORATI *et al.*, 2016). A TBK1 é uma serina-treonina quinase celular que é essencial para a sinalização imunológica antiviral inata, proliferação celular e outros processos (FARIK *et al.*, 2012; HELGASON *et al.*, 2013; PILLAI *et al.*, 2015). Sem infecção por ZIKV, o pTBK1 estava localizado em centrossomos das células corticais e células gliais radiais, enquanto nas células infectadas pelo ZIKV, o pTBK1 foi realocado para as mitocôndrias. As células infectadas pelo ZIKV também exibiram uma progressão mitótica interrompida, incluindo um número crescente de células contendo mais de dois centrossomos. Como esperado, o inibidor de TBK1 Amlexanox prejudicou a mitose, provocou centrossomas supranumerários em células NES e exacerbou a morte celular induzida por ZIKV (ONORATI *et al.*, 2016).

Apesar de diversos estudos, usando diferentes modelos experimentais, estabeleceram que o ZIKV induz anormalidades graves em células em divisão (FAIZAN *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; GABRIEL *et al.*, 2017), ainda não está definido o mecanismo como o vírus interfere com o ciclo celular. Além disso, o perfil transcricional de células progenitoras neurais humanas infectadas revelou uma desregulação das vias relacionadas ao ciclo celular e à diferenciação em células progenitoras neurais (DANG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016). Recentemente, investigando o efeito de proteínas individuais do ZIKV *in vitro*, verificou-se que a expressão da proteína do capsídeo ancorada à membrana, a proteína E, proteína M e a proteína NS4A poderiam desencadear o prisão do ciclo celular na fase G2 / M e levar a morte por apoptose (LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018). Curiosamente, a proteína M induz a parada do ciclo celular em G2 / M, enquanto a proteína prM resulta em acúmulo de G1 (LI *et al.*, 2017), revelando que o processamento pós-tradução modifica sua interferência progressão do ciclo celular.

2.11 APC e Cdc20

O APC é uma ligase-ubiquitina multifuncional que interage com diversos substratos direcionando-os para ubiquitinação e, portanto, regula uma variedade de processos celulares como divisão e diferenciação celular, estabilidade genômica, metabolismo energético, autofagia e carcinogênese (ZHOU *et al.*, 2016). Por regular a degradação de substratos como ciclinas, securinas, quinases mitóticas, microtúbulos motores e fatores de montagem, o APC controla a segregação das cromátides irmãs, citocinese e a iniciação da duplicação dos cromossomos (PINES, 2011). O complexo inteiro é formado por 19 subunidades menores e, em organismos vertebrados, o complexo é formado por 15 holoenzimas (**Figura 13**) junto com as subunidades co-ativadoras Cdc20 ou Cdh1 (CHANG *et al.*, 2015).

Figura 13- Estrutura do complexo APC

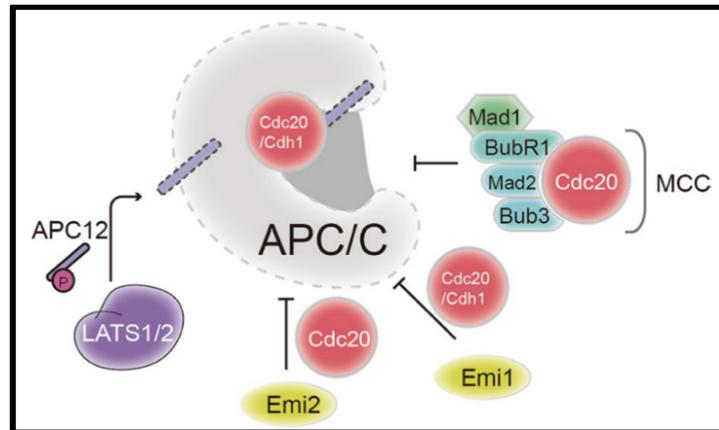


Fonte: Zhou *et al.* (2016)

Além destes dois co-fatores citados anteriormente, a ativação e/ou desativação do APC durante a progressão do ciclo celular também é determinada pela fosforilação do APC, o complexo de ponto de controle mitótico (MCC) e o inibidor mitótico da interfase 1 (Emi1) (**Figura 14**). O MCC que contém as proteínas do ponto de controle da montagem do fuso mitótico (SAC), que inclui MAD2/MAD3, BUB3 e Cdc20 previne a entrada precoce na anáfase por inibir a atividade do APC (KAPANIDOU; BOLANOS-GARCIA, 2017; ZHOU *et al.*, 2011). O Emi1 tem um papel significativo no controle da

interfase, por inibir a atividade da APC, durante o ciclo celular, aumentando os níveis de ciclina sinalizando a entrada para a mitose (PINES, 2011; ZHOU *et al.*, 2016).

Figura 14- Regulação da atividade do APC durante o ciclo celular

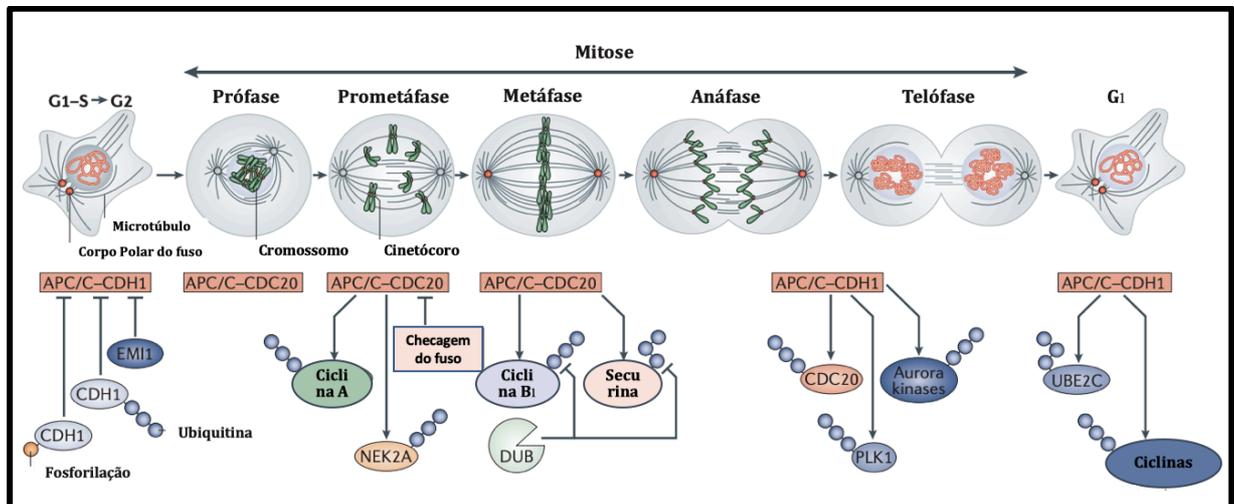


Fonte: Zhou *et al.* (2016)

O grande impacto da função do APC está relacionado com a progressão do ciclo celular (**Figura 15**), embora seja pouco conhecido a sua função nos processos de apoptose, estabilidade genômica, metabolismo, entre outros (HUANG; BONNI, 2016). O APC está inativo durante a fase G1 até o início da mitose, o que permite que seus principais substratos se acumulem no interior da célula, entre estes estão securina, quinases mitóticas e ciclina e após a entrada das células na mitose o APC é ativado por fosforilação.

Quando o APC está ativado, é essencial que o complexo não degrade a securina ou ciclina até que todos os cromossomos estejam conectados ao aparelho mitótico. A ação da APC é controlada pelo SAC, ponto de verificação extremamente eficaz que inibe o Cdc20 e, portanto, o APC, até que todos os cinetocóros estejam ligados aos microtúbulos do fuso para o momento da segregação cromossômica (MUSACCHIO *et al.*, 2007; PINES, 2011; ZHOU *et al.*, 2016). O SAC ativa e sequestra o Cdc20 do APC quando erros acontecem durante a mitose, como por exemplo, alinhamento incorreto das fibras do fuso ou ligação incorreta dos cinetocóros às cromátides irmãs, impedindo dessa forma o avanço do processo de divisão celular (ZHOU *et al.*, 2016).

Figura 15- O papel do APC e seus co-fatores CDC20 e CDH-1 durante a progressão do ciclo de divisão celular



Fonte: Sivakumar e Gorbsky (2015, tradução nossa).

Quando a verificação dos pontos de montagem dos fusos mitóticos está correta ou algum possível erro foi corrigido a inibição do SAC exercida sobre o Cdc20 é reduzida, sinalizando para a degradação das moléculas de securina e ciclina, assegurando a transição da metáfase para anáfase e a separação das cromátide irmãs (PINES, 2011). De acordo com a literatura, alguns vírus como, HCMV, HPV e o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) interagem com o APC, interferindo no processo de divisão celular, visando garantir sua replicação viral (KAPANIDOU; BOLANOS-GARCIA, 2017; MO *et al.*, 2012;). Em um estudo recente, Liang *et al.* (2016), analisaram a expressão de diversos genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Dentre os genes analisados os pesquisadores verificaram a *down*-regulação da expressão da proteína Cdc20 (LIANG *et al.*, 2016), demonstrando dessa maneira que o ZIKV desregula o ciclo mitótico das células infectadas, mas o mecanismo dessa interação vírus-hospedeiro continua não elucidado.

No que concerne a função do APC em outros processos celulares, muito pouco já foi esclarecido. Recentes estudos demonstraram a importância do complexo na regulação da apoptose, o APC-Cdc20 degrada as proteínas anti apoptóticas Mcl-1 e pro apoptóticas Bim. A fosforilação da Mcl-1, quando as células param na mitose, leva a degradação por ubiquitinação, via APC, e sinaliza o início da apoptose quando a célula não consegue realizar a mitose. A proteína Bim também é substrato para o

APC, e quando o complexo de alguma forma está inibido seja por defeito genético, uso de fármacos inibidores ou processos tumorais, ocorre estabilização da Bim, no interior da célula, que sinaliza o início da apoptose (HARLEY *et al.*, 2010; WAN *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2016). Novas evidências sugerem também o papel do APC na regulação do desenvolvimento neuronal e que o APC-Cdc20 conduz a morfogêneses dos dendritos e a diferenciação pré sináptica por degradar os fatores de transcrição Id1 e NeuroD2 (KIM *et al.*, 2009; HUANG; BONNI, 2016; WAN *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

O ZIKV, no último triênio, ganhou ênfase no contexto da saúde pública global em consequência ao seu alto grau de disseminação e o aumento repentino no número de casos de infecção notificados, além da correlação com o aumento da incidência de outras doenças como SGB e SCZ. Esses fatores resultam em alto impacto socioeconômico com consequências a longo prazo, dado que, uma vez acometidos pela doença neurológica os pacientes necessitam de acompanhamento especializado.

Devido à natureza severa das complicações envolvendo, principalmente, mulheres grávidas e a capacidade que o ZIKV possui de comprometer o desenvolvimento neuronal fica evidente a necessidade de compreender os mecanismos de patogênese envolvidos na infecção viral. Nesse contexto, estudos sobre a interação proteica do ZIKV com o maquinário celular do hospedeiro podem fornecer informações importantes para o entendimento da patogênese, elucidando os mecanismos moleculares e indicando possíveis alvos terapêuticos. Apesar do avanço já obtido acerca da biologia do vírus ao se abordar a patogênese, são poucos os trabalhos que estudam a relação do ZIKV com as alterações envolvendo o ciclo celular. Sendo assim, a proposta desse trabalho foi estudar a interação das proteínas estruturais e não estruturais do vírus com o Cdc20, proteína do ciclo mitótico, analisando a expressão dessa proteína em células neuronais infectadas e transfectadas com os genes do ZIKV caracterizando, dessa maneira, uma possível via de interação do vírus com a célula hospedeira que poderia ser um dos fatores a explicar o efeito do vírus em comprometer o desenvolvimento neuronal.

4 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo analisar a interação da proteína Cdc20 com as proteínas virais do ZIKV para estudar a possível desregulação do ciclo mitótico causado pelo vírus

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar, individualmente, a interação da proteína celular Cdc20 com as proteínas estruturais e não estruturais do ZIKV em células SH-SY5Y frente à infecção induzida.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a expressão de Ccd20 em células SH-SY5Y não infectadas e infectadas pelo ZIKV;
- b) Analisar a expressão de Cdc20 em células SH-SY5Y transfectadas com os genes estruturais e não estruturais do ZIKV separadamente;
- c) Avaliar a taxa de proliferação das células SH-SY5Y quando transfectadas com cada gene estrutural e não estrutural do ZIKV;
- d) Verificar o efeito das proteínas do ZIKV no ciclo celular em células transfectadas com os genes estruturais e não estruturais.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O estudo foi realizado seguindo os procedimentos metodológicos descritos abaixo.

5.1 Local do Experimento

Todo o projeto foi realizado no Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (IAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – Pernambuco) que contém laboratórios de pesquisa e inovação com a infraestrutura necessária para o pleno desenvolvimento do projeto, apresentando equipamentos laboratoriais modernos que viabilizam a execução do mesmo. O Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), que está inserido no IAM e dispõe de um laboratório de cultura celular completo. Todos os procedimentos operacionais padrão usados no IAM seguem os regulamentos de biossegurança descritos no Plano Quadrienal da FIOCRUZ 2005/2008, e ISSO 17025, além de conter todos os equipamentos requeridos para nível de segurança 2, de acordo com a Lei 11.105/2005 da CTNBio.

5.2 Linhagens Celulares

Para a realização desse estudo foram utilizadas duas linhagens de células distintas: VERO (ATCC® CCL81™) e células SH-SY5Y ATCC®CRL2266™.

5.2.1 Células VERO (ATCC® CCL81™)

As células Vero correspondem à linhagem de rim de macaco-verde africano e foram obtidas originalmente da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) e cultivadas em garrafas T-75 a $1,0 \times 10^6$ células por garrafa em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução de antibiótico penicilina/estreptomicina (PEN/STREP) (1%). Depois disso as células foram mantidas em estufa à 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

5.2.2 Células SH-SY5Y (ATCC®CRL2266TM)

As células neuronais humanas, SH-SY5Y, foram obtidas originalmente da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) e cultivadas em garrafas T-75 a $1,0 \times 10^6$ células por garrafa em meio 1:1 de *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) e HAM-F12 (F12) ambos da marca Gibco™ suplementado com 10% de SFB, 1% de solução de antibiótico PEN/STREP, 1% de solução de aminoácidos essenciais e piruvato de sódio. Depois disso as células foram mantidas em estufa à 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

5.3 Vírus Zika

Foi utilizada a cepa asiática dos ZIKV nos experimentos que serviu como controle positivo para comparação com os vetores plasmidiais.

5.3.1 Identificação da amostra viral

A cepa asiática *ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015* utilizada nos experimentos foi isolada no segundo dia após o aparecimento dos sintomas da infecção em uma paciente de 19 anos, residente da cidade do Recife, capital pernambucana, em maio de 2015. A pesquisa de IgM realizada no soro da paciente foi positiva para ZIKV. O isolamento do vírus foi efetuado no LaViTE e nos foi doado pela Dra. Marli Tenório, pesquisadora sênior do mesmo.

5.3.2 Produção do estoque viral

Uma amostra do vírus foi inoculada em células VERO (ATCC) e incubada em estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias até que se observasse efeito citopático no tapete celular. Posteriormente, a garrafa de cultura passou por um ciclo de congelamento e descongelamento e a suspensão foi transferida para um tubo *Falcon* e então centrifugada à 400RCF/ 10 minutos sobre temperatura de refrigeração (4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante – o qual contém as partículas virais – foi aliquotado em criotubos em um volume de 1mL.

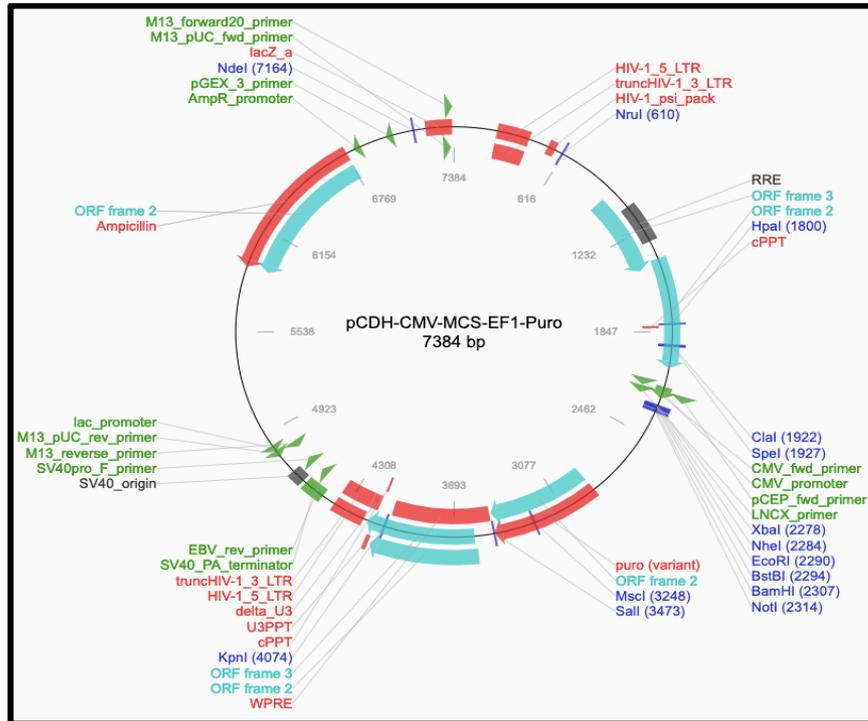
5.3.3 Titulação do estoque viral

O estoque do vírus foi titulado por meio do ensaio de placa. Para tal, células VERO ($1,0 \times 10^5$ células/ poço) foram infectadas com diluições seriadas dos estoques de vírus Zika. Após 1 hora de adsorção em estufa à 37°C e 5% de CO₂, o inóculo foi retirado e então adicionado o meio contendo 1% de carboximetilcelulose em volume final de 2 mL por poço. Após 6 dias de infecção, as células foram fixadas com formalina e, logo em seguida, coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa (UFP/mL).

5.4 Vetor pCDH contendo os genes do ZIKV

Os plasmídeos contendo os genes do ZIKV foram cedidos pelo laboratório Dr. Jae U. Jung (Departamento de Microbiologia Molecular e Imunologia, Universidade da Escola de Medicina de Xangai). Ao todo foram doados 2 µL de cada plasmídeo contendo os genes estruturais e não estruturais do ZIKV (E, prM, C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), estocados a -20°C. Os genes foram inseridos no vetor de clonagem pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (**Figura 16**). O plasmídeo é composto por regiões pCDH, que indica vetor lentiviral de cDNA; CMV é a região promotora de citomegalovírus; MCS é a região de *multicloning site* (local onde o inserto foi inserido) e o EF-1fator de alongação que garante a expressão de puromicina. Os plasmídeos contendo os genes do ZIKV estão descritos com detalhes no **Quadro 1** e na seção de anexo no final deste trabalho.

Figura 16- Representação do plasmídeo pCDH e suas regiões



Fonte: Addgene Headquarters (2019).

Quadro 1- Descrição dos plasmídeos contendo os genes do ZIKV

Nome plasmídeo	Gene inserido	Tamanho do amplicon	Tamanho do plasmídeo
pCDH-E	Envelope	1519pb	8873pb
pCDH-prM	Precursora de membrana	511pb	7865pb
pCDH-Cap	Capsídeo	353pb	7729pb
pCDH-NS1	NS1	1062pb	8419pb
pCDH-NS2A	NS2A	684pb	8041pb
pCDH-NS2B	NS2B	396pb	7753pb
pCDH-NS3	NS3	1854pb	9214pb
pCDH-NS4A	NS4A	454pb	7813pb
pCDH-NS4B	NS4B	759pb	8116pb
pCDH-NS5	NS5	2714pb	10072pb

Fonte: O Autor, (2019).

5.5 Células DH5 α

Além das linhagens eucarióticas, foram utilizadas células procarióticas *E. coli* (cepa DH5- α) para os experimentos de transformação bacteriana.

5.5.1 Preparação de células DH5 α quimicompetentes

Bactérias *E. coli*, cepa DH5 α (utilizadas para clonagem gênica) obtidas comercialmente da companhia *Invitrogen*, foram tornadas quimicamente competentes para a recepção de DNA plasmidial por meio de tratamento à base de cátions bivalentes (cálcio, Ca⁺⁺ e magnésio, Mg⁺⁺). Uma colônia de cada linhagem celular foi inoculada em cinco mililitros (mL) de meio Luria Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl), e submetida a crescimento à 37°C, 225 rotações por minutos (rpm), *overnight*. Após esse período, esse pré-inóculo dessa cultura foi transferido para 500 mL de meio LB, e submetidos à agitação de 225rpm, 37°C, até a cultura atingir uma densidade óptica (OD) entre 0,5 e 0,6 (aproximadamente 2x10⁸ células/mL) no comprimento de onda de 600 nm.

As células foram resfriadas em gelo durante uma hora, e transferidas para tubos de polipropileno gelados para serem centrifugadas à 4°C, 5500 rpm, por cinco minutos. As células foram mantidas à temperatura de aproximadamente 4°C em todos os passos subsequentes. O sobrenadante foi removido, e as células foram totalmente ressuspensas em 30 mL de solução 100 milimolar (mM) de cloreto de cálcio (CaCl₂) gelada. Após 30 minutos de incubação no gelo e nova centrifugação a 4°C, 5000 rpm por sete minutos, as células foram ressuspensas em cinco ml de solução 100 mM CaCl₂ gelada, acrescida de 15% glicerol, aliquotadas e armazenadas à -80°C. A eficiência de transformação das células foi verificada através da contagem do número de transformantes obtidos com 1 μ g de plasmídeo de DNA *supercoiled* pUC19 (Sigma-Aldrich).

5.5.2 Transformação bacteriana

Inicialmente duas amostras das células competentes foram descongeladas em gelo. Para 40 μ L de células competentes, foram adicionados 1,5 μ g do DNA

plasmideal. Outra reação foi realizada, paralelamente, com a mesma mistura exceto o DNA e esta foi utilizada como controle negativo do experimento.

Cada mistura foi submetida a um ciclo térmico de 30 minutos em banho de gelo, 50s a 42°C e 2 min em banho de gelo, então, adicionou-se para cada *ependorf* 250 µL de meio LB líquido. Os tubos foram incubados por 1h a 37°C em banho maria, para a regeneração das células e posteriormente centrifugados por 10min a 3000 rpm. Após esse processo, foi inoculado 50 µL da solução em meio LB sólido com 100µg/mL de ampicilina (para a seleção das colônias), sendo incubadas *overnight* a 37°C para o crescimento bacteriano.

5.5.3 Extração do DNA plasmidial

Colônias bacterianas resistentes à seleção pelo antibiótico foram previamente selecionadas e colocadas em um tubo cônico contendo 5mL de meio LB suplementado com 100µg/mL de ampicilina e incubada sob agitação de 180 rpm a 37°C por 16h. Um volume de 1:50 dessa pré-cultura foi transferido para um frasco tipo *Erlenmeyer* contendo 50mL de LB com ampicilina e incubado sob agitação de 180 rpm, 37°C. Após esse período, a cultura bacteriana foi colocada em tubos cônicos de 50mL e centrifugada a 1500g por 30min. O procedimento de extração plasmidial foi feito de acordo com o protocolo de extração e purificação por centrifugação descrito no kit (Promega *Pure Yield™ Midiprep System*). O DNA resultante foi diluído para posterior quantificação e sequenciamento. Após a extração o DNA plasmidial foi corrido e observado em gel de agarose para confirmar a presença de DNA nas colônias selecionadas.

5.5.4 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição

Para a confirmação dos insertos, os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão. A digestão foi realizada para confirmar a presença do gene no plasmídeo e para isto foram selecionadas enzimas de restrição de maneira que uma fosse capaz de digerir o gene e outra de digerir o vetor, formando dois fragmentos facilmente identificáveis em eletroforese de gel de agarose.

Os ensaios de digestão foram realizados num volume final de 10µL, contendo no máximo 5µg de DNA. O tampão da reação foi utilizado de acordo com o fabricante;

água deionizada e as enzimas de restrição (*New Englands Biolabs*) para cada plasmídeo. A confirmação dos genes inseridos no vetor pCDH foram realizadas por provas de clivagem externas, utilizando as enzimas de clonagem e clivagens internas (específicas para cada gene) (**Quadro 2**). A reação de digestão foi realizada em um volume final de 10 μ L, que consistiu em 2 μ g de DNA da miniprep, 1 μ L de tampão, 0,5U de cada enzima, 6 μ L de água Milli-Q estéril. A reação foi mantida a 37°C por 8 horas e depois inativadas por 20min a 65°C. Os fragmentos gênicos obtidos foram fracionados em gel 1% agarose e corados com brometo de etídio (BrEt). Desta forma a confirmação dos plasmídeos foi realizada usando provas de clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento.

Quadro 2- Enzimas usadas para o ensaio de digestão de acordo com o gene inserido

Genes	Enzimas de clonagem (clivagem externa)	Enzimas confirmatórias (clivagem interna)
E	NheI, NotI	XbaI
prM	NheI, NotI	XbaI
Cap	BamHI, XbaI	BglII
NS1	BamHI, XbaI	Sall
NS2A	BamHI, XbaI	SphI
NS2B	BamHI, XbaI	PstI
NS3	BamHI, XbaI	SphI
NS4A	BamHI, XbaI	BglII
NS4B	BamHI, XbaI	SacI
NS5	NheI, NotI	XbaI

Fonte: O Autor, (2019).

5.5.5 Eletroforese em gel de agarose

A integridade do DNA obtido após a extração por Midiprep em kit e os ensaios de digestão foi verificada por eletroforese em géis de agarose com BrEt. Os géis de agarose (1%) foram preparados em tampão 1xTAE (2M Tris-base, 0,4mM NaOAc, 20mM disodium-EDTA, pH8) com Et-Br 0,5 μ g/ml. Às amostras foi adicionado tampão de aplicação (125mM EDTA, 5% glicerol, azul de bromofenol e xileno cianol) e foram depois corridas ao lado de um marcador molecular (1Kb ladder, *New Engand Biolabs*).

Os géis foram corridos a 100v, 150mA, 100W em tampão TAE, durante uma hora. O DNA foi visualizado num transiluminador (UV) e fotografado usando o aparelho LPIX *Molecular Imaging*- Looccus Biotecnologia.

5.5.6 Quantificação do DNA plasmidial

Na análise por espectrofotometria foi utilizado o aparelho NanoDrop® 2000 (*Thermo Scientific*) para quantificação da concentração de DNA obtido juntamente com a pureza dos mesmos por meio das relações das leituras 260nm/280nm para contaminação com proteínas e 260nm/230nm para observar contaminação com sais e álcool. Para a primeira relação foram considerados aceitáveis valores na faixa de 1,8 a 2,0. Já para a segunda relação os valores aceitáveis devem ficar na faixa de 2,0 a 2,2.

5.5.7 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos genes inseridos nos vetores, foi realizado o desenho de *primers* específicos para cada gene. O DNA extraído foi enviado para o sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) da própria instituição.

5.5.7.1 Desenho dos primers

Os pares de *primers* foram desenhados flanqueando cada gene do ZIKV inserido no vetor, tomando-se como base as sequências enviadas por Jung *et al.* e confirmadas no *GenBank*. Para todos os genes do ZIKV foram selecionadas regiões conservadas no plasmídeo que flanqueavam o inserto de cada gene, esses pares de *primers* foram denominados *Forward Externo* e *Reverse Externo* (pCDH-F e pCDH-R) respectivamente. Para os genes com mais de 1000pb (ENV, NS3 e NS5) foi desenhado um segundo par de *primers* na região interna de cada gene. Todas as sequências genômicas foram alinhadas com o auxílio do programa *Genome Compiler* e sua capacidade de formação de homodímeros, heterodímeros, proporção conteúdo CG e a formação de *hairpin* foram analisadas com auxílio do programa *Oligo Analyzer*. A sequência de cada *primer* desenhado está descrita no **Quadro 3**.

Quadro 3- Sequência dos primers externos e internos utilizados para a amplificação e sequenciamento dos genes do ZIKV

Primers	Sequência (5'-3')	Região
pCDH-F	AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACC	Genes: prM, Cap, NS1, NS2A, NS2B, NS4A, NS4B
pCDH-R	TAGGCACCCGTTCAATTGC	
InterE-F	GACATCCCATTCCTTGCC	Gene E
InterE-R	TTGCACCATCCATCTCAGCCT	
InterNS3-F	CCCACTTCACAGACCCCTCA	Gene: NS3
InterNS3-R	GTGAGTTAGAGTCAGGAAACGC	
InterNS5-F	AATGCAGCACTGGGAGCA	Gene: NS5
InterNS5-R	AGGTGGTGTCTCTCTCCCTAT	

Fonte: O Autor, (2019).

5.5.7.2 PCR

Para confirmar se os *primers* foram desenhados corretamente e eram capaz de se anelar aos insertos de cada plasmídeo, foi realizado um PCR convencional utilizando esses *primers*. Para os insertos do E, NS3 e NS5 além dos *primers* externos foram utilizados também os pares de *primers* internos específicos para cada gene, como descrito na **Quadro 3**. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando o MasterMix GoTaq® (Promega, EUA) e avaliadas em gel de agarose a 1%. O protocolo de ciclagem está descrito na **Quadro 4**.

Tabela 4- Protocolo de ciclagem utilizados para PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos
35 ciclos		
Desnaturação	95°C	30 segundos
Anelamento	56°C	30 segundos
Extensão	72°C	45 segundos
Extensão Final	72°C	5 minutos

Fonte: O Autor, (2019).

5.5.7.3 Sequenciamento e análise

O sequenciamento foi realizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) - FIOCRUZ/PE, utilizando o aparelho *Applied Biosystem 3500xL Genetic Analyzer* que consiste em uma plataforma automatizada com capacidade de analisar simultaneamente 24 amostras por eletroforese capilar. Foram utilizados 1uL (300ng) de DNA, 3,2 pmoles de cada *primer*, 1,5uL de Big Dye + Tampão.

As sequências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento dos plasmídeos foram comparadas com dados genéticos o *GenBank* por meio do programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997) que permite a procura de uma proteína a partir de uma sequência de nucleotídeos, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. As buscas resultantes são ordenadas por valores decrescentes de *Bit Score*. À medida que o valor do *score* decai, e o correspondente *E-value* aumenta, menor é a homologia entre as sequências analisadas.

5.6 Infecção de células SH-SY5Y

As células neuronais, na quantidade 1×10^6 células por frasco de cultivo T-25cm² foram infectadas na multiplicidade de infecção (MOI) de 1, o que equivale a uma partícula viral por célula. As células foram infectadas 24h pós repique, ao apresentarem confluência de 90%, que corresponde a 9×10^5 células por garrafa aproximadamente. A suspensão viral foi diluída em meio DMEM com MOI igual a 1,0. A adsorção foi realizada por um período de 2h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ saturado e foram homogeneizadas a cada 15 minutos. Após esse período, o volume das garrafas foram completados para 7mL com meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de PEN/STREP. As células foram mantidas na condições de incubação por até quatro dias e posteriormente, foram lisadas e o extrato proteico obtido foi armazenado para análise de *imunoblotting*.

5.7 Transfecção das células SH-SY5Y

Antes de iniciar as transfecções em SH-SY5Y com os plasmídeos contendo os genes do ZIKV, foi necessário padronizar a transfecção usando plasmídeo pMEG-

GFP o qual possui a região codificadora da proteína fluorescente verde (GFP) (do inglês, *green fluorescent protein*). Cerca de 24 horas antes da transfecção, as células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de cultivo de 24 poços (2×10^5 células/poço) em meio MEM/F12 suplementado com 10% de SFB, no volume final de 500 μ L, estas células foram aderidas à placa por 24h e no dia seguinte foi realizada a transfecção. Para a lipofecção das células utilizou-se o agente de transfecção *Lipofectamine 3000*TM.

O agente de transfecção e o plasmídeo pMEG foram diluídos separadamente, em meio Opti-MEM (*Gibco*), meio com redução de soro, separadamente para um volume final de 100 μ L. Essas diluições foram incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos. Após a incubação, misturaram-se as soluções diluídas, com nova incubação por 30min à temperatura ambiente, possibilitando a formação do complexo lipossomo/DNA. Estes complexos foram dispensados no poços contendo as células e em seguida foi adicionado 100 μ L de meio MEM/F12 e as células foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 3h, após esse período o volume final de cada poço foi completado para 500 μ L com meio MEM/F12. A concentração de DNA recomendada pelo fabricante para os ensaios de transfecção é de 0,5 - 5 μ g e o volume sugerido de lipofectamina varia de 1-2 μ L. Logo, optou-se por testar 0,5, 1 e 2 μ g de DNA e 2 e 3 μ L de lipofectamina em 24 e 48 horas pós transfecção.

5.8 Preparação dos extratos protéicos

As células infectadas e tranfectadas foram mantidas em cultura por até 4 dias pós infecção/transfecção e posteriormente, lisadas. Os precipitados de células para a extração protéica foram obtidos por meio da tripsinização celular, quando as mesmas encontravam-se em confluência de aproximadamente 80%. As proteínas foram extraídas em tampão de lise RIPA (*Sigma Aldrich*, Burchs, SG, Switzerland) contendo inibidores de proteases e fosfatases (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, EUA). Duzentos microlitros deste tampão foram adicionados sobre os precipitados celulares os quais foram desagregados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos. Depois deste período foi realizada centrifugação a 14 000 rpm por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados. Todos os extratos proteicos foram imediatamente armazenados em *freezer* -80°C, no qual foram mantidos até a realização das análises subsequentes. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford usando

reagente comercial, seguindo as instruções do fabricante (Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland).

5.9 Western blotting

Para a detecção da proteína Cdc20 proveniente das células transfectadas com o plasmídeo pCDH, os respectivos extratos protéicos foram resolvidos em SDS-PAGE, o qual, em seguida, foi submetido ao método de *Western Blotting*. As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli a fim de se obter a quantidade de 40µg em 20µL, foram desnaturadas à 95°C durante 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poli-acrilamida de 12% para o fracionamento. Em um dos poços foram aplicados 5µL do marcador de peso molecular pré corado (*Thermo Scientific*, EUA).

Após a eletroforese, procedeu-se à transferência das proteínas do gel de poli-acrilamida para membrana de nitrocelulose com o auxílio do sistema de transferência *Transf Dry* (BioRad). Realizada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 6h a temperatura ambiente sob agitação em solução de bloqueio contendo tampão PBS 1X suplementado com 0,1% de Tween-20 (PBST) 0,1% 1x e 7,5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi incubada sob agitação à 4°C, *overnight*, em solução 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) à qual foi adicionado o anticorpo primário anti-Cdc20 (diluição 1:1000). Após essa incubação, a membrana passou por cinco etapas de lavagem em PBST. Cada lavagem teve duração de 5 minutos sendo realizadas à temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi novamente incubada, por 1h em solução de PBST 0,1% 1x contendo 5% leite desnatado adicionada do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase na diluição de 1:30000. Em seguida, a membrana passou pelas mesmas lavagens descritas anteriormente. Para a revelação da membrana utilizou-se o aparelho *ImageQuant LAS 500* (*GE Healthcare*, Chicago, Illinois, EUA), segundo o protocolo do fabricante. O tempo de exposição da membrana variou de acordo com a proteína que estava sendo detectada. Para a marcação da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que serviu de controle endógeno do procedimento, seguiu-se o mesmo protocolo descrito acima, mudando somente a diluição do anticorpo primário, anti-GAPDH (diluição 1:1000).

5.10 Imunofluorescência

Com o objetivo de confirmar a infecção e a transfecção das células SH-SY5Y foram realizados ensaios de imunomarcação da proteína E do vírus com o anticorpo monoclonal panflavivírus “4G2” *in house* e a marcação com anticorpos específicos para cada proteína, anti-E, anti-prM, anti-Cap, anti-NS1, anti-NS2B, anti-NS3, anti-NS4B e anti-NS5 (*GeneTex*), e visualizados utilizando microscópio de epifluorescência. Para tal, $2,0 \times 10^5$ células SH-SY5Y cultivadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula circular de 13mm (*Knittel*) ao fundo de cada poço para que as células fossem aderidas a superfície da lamínula. Após 24h de incubação em estufa, um grupo de células foram infectadas com ZIKV com MOI 1,0 enquanto outro grupo de células foi transfectado com os plasmídeos usando 2 μ L de lipofectamina e 1 μ g de DNA. As células foram mantidas em estufa por 48h, após esse período os sobrenadantes foram desprezados e os tapetes celulares foram fixados com 500 μ l de paraformaldeído (PFA) a 4,0% (*Electron Microscopy Sciences*) por 15 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Após fixação as células foram lavadas com PBS 1x (por 3 vezes) e permeabilizadas com Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*®) a 0,1% por 10 minutos, também a T.A. Após permeabilização, foi realizada a etapa de bloqueio utilizando 500 μ l de gelatina porcina 0,2% (*Sigma-Aldrich*®) por 20 minutos a 37°C. Feito isto, 20 μ l do anticorpo 4G2 ou anticorpo específico para cada proteína foram pipetados para cada reação sobre um papel filme, e as lamínulas foram transferidas para o mesmo com as células voltadas para baixo sobre as gotas do anticorpo e foram então incubadas em câmara úmida a 37°C/ 1h. Depois, as lamínulas foram lavadas por imersão (10x) em PBS 1x para remoção do excesso de anticorpo. Após a lavagem, as células foram incubadas por 30 minutos, também em câmara úmida, desta vez com 10 μ l do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:2000) (*Invitrogen*™) e 10 μ l de Hoechst 33258 (1:4000) (*Sigma-Aldrich*®), este último utilizado para corar o núcleo das células. Após incubação, mais uma etapa de lavagem por imersão em PBS 1x foi realizada e então as lâminas foram montadas. O processo de montagem foi realizado com Fluoromount G – 6 μ l/ lamínula – (*Electron Microscopy Sciences*) e então, as lâminas foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Leica DMI 4000 B, em aumento de 63x óleo e posteriormente analisadas com auxílio do software *Fiji Image J*. Para cada grupo pós-infecção/pós-transfecção foram utilizadas três replicatas

biológicas, as quais foram comparadas às células MOCK (não infectadas). Os resultados deste ensaio são produto de três experimentos independentes.

5.11 Ensaio de proliferação celular

Para determinar se as proteínas do ZIKV eram capazes de desregular a capacidade proliferativa das células neuronais foi feito estudo de proliferação celular baseado na marcação do antígeno Ki-67 nas células transfectadas. A determinação da expressão de Ki-67 foi realizada por meio de citometria de fluxo usando o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 conjugado com FITC. Para tal, $1,0 \times 10^5$ células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas por 24h em estufa de 5% de CO₂ à 37°C. Após esse período, as células foram infectadas com ZIKV com MOI 1,0 enquanto outro grupo de células foram transfectadas com os plasmídeos usando 2µL de lipofectamina e 1µg de DNA e mantidas em estufa por até 5 dias. A cada 24h os sobrenadantes foram desprezados, as células foram tripsinadas por 5 minutos a 37°C, coletadas em tubos eppendorfs, lavadas com PBS e centrifugadas por 350RCF por 5 minutos. Depois dessa etapa o sobrenadante foi desprezado e adicionado, por gotejamento, 1mL de etanol e a suspensão foi vortexada por 30 segundos sendo armazenado a -20°C por 48h. Para a citometria, as amostras foram centrifugadas e o sedimento ressuspendido em PBS 1x, seguido de nova centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento, foi adicionado o anticorpo anti-Ki-67 FITC de acordo com recomendações técnicas do fabricante, e ao tubo controle, foi adicionado o controle isotópico. Os tubos foram incubados em câmara escura à T.A. Após a marcação dos anticorpos monoclonais, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACSCalibur, da Becton Dickinson), utilizando-se o FACS Diva software, versão 3.1 (*Cell Quest™ Software*) com aquisição de 10.000 eventos no gate de células neuronais. A partir da janela de análise estabelecida para os parâmetros de dispersão luminosa para o tamanho (FSC – *forward scatter*) e a complexidade interna celular (SSC – *side scatter*), foram obtidos gráficos do tipo *dot plot* nos canais de fluorescência para FL1 (FITC) e para FL2 (PE). Os resultados foram fornecidos na forma de percentagem de células neuronais positivas para o anticorpo monoclonal estudado.

5.12 Ensaio ciclo celular

Para determinar se as proteínas do ZIKV interferiam, de alguma maneira, com o ciclo celular das células neuronais foi analisado o comportamento do ciclo celular nessas células baseado na marcação com iodeto de propídeo (PI) nas células transfectadas. O PI é um fluorocromo capaz de marcar DNA e proporciona a medida do percentual de células em cada fase do ciclo celular (G1/S/G2) e por isso é utilizado em para análises do ciclo celular. Para tal, $1,0 \times 10^5$ células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas por 24h em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as células foram infectadas com ZIKV com MOI 1,0 enquanto outro grupo de células foi transfectado com os plasmídeos usando 2µL de lipofectamina e 1µg de DNA e mantidas em estufa por até 2 dias. A cada 24h os sobrenadantes foram desprezados, as células foram tripsinadas por 5 minutos à 37°C, coletadas em tubos *ependorfs*, lavadas com PBS e centrifugadas por 350 RCF por 5 minutos. Depois dessa etapa o sobrenadante foi desprezado e adicionado, por gotejamento, 1mL de etanol e a suspensão foi vortexada por 30 segundos sendo armazenado a -20°C por 48h. Para a citometria, as amostras foram centrifugadas e o sedimento ressuspendido em PBS 1x, seguido de nova centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento, foi adicionado uma solução de PI, e ao tubo controle, foi adicionado o controle isotípico. Os tubos foram incubados em câmara escura à T.A por 30m. Após a marcação dos anticorpos monoclonais, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACSCalibur, da Becton Dickinson), utilizando-se o FACS Diva *software*, versão 3.1 (*Cell Quest™ Software*) com aquisição de 10.000 eventos no *gate* de células neuronais. A partir da janela de análise estabelecida para os parâmetros de dispersão luminosa para o tamanho (FSC – *forward scater*) e a complexidade interna celular (SSC – *side scater*), foram obtidos gráficos do tipo *dot plot* nos canais de fluorescência para FL1 (FITC) e para FL2 (PE). Os resultados foram fornecidos na forma de percentagem de células neuronais em cada fase do ciclo celular.

5.13 Análise Estatística

Quando necessário, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa *GraphPrism 5.0 Software* (Jandel Scientific, San

Rafael, CA). Os resultados foram expressos em termos da média aritmética de três repetições e foram considerados significativos quando apresentaram valores \leq a 0,1 (*) e valores \leq a 0,05 (**).

5.14 Considerações éticas

O estudo não necessitou de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos nem do Certificado de Licença do Comitê de Ética no uso de Animais, pois não utilizou de nenhum material proveniente de amostras humanas nem envolveu o uso de animais vertebrados.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos no desenvolvimento deste projeto estão descritos nos itens abaixo:

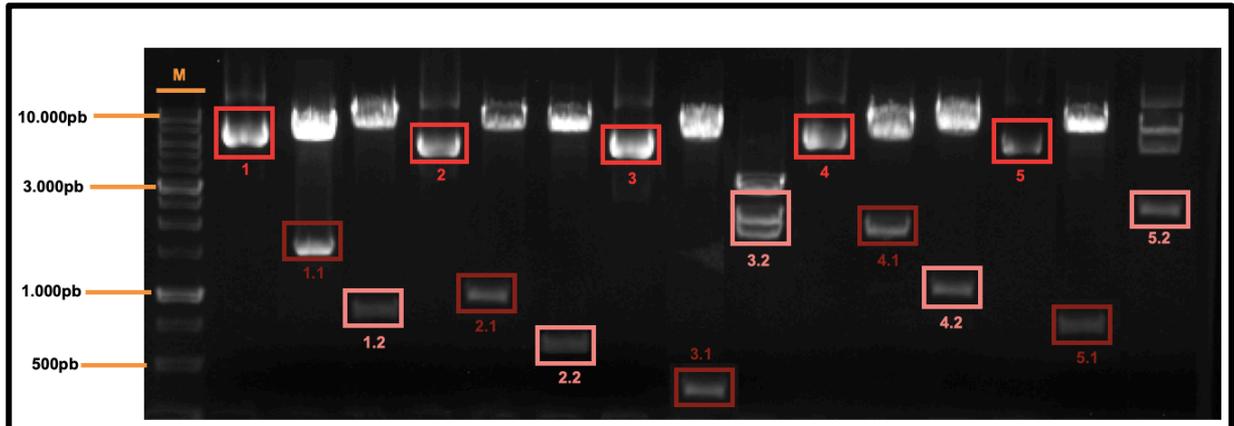
6.1 Caracterização dos genes clonados nos vetores

A confirmação das clonagens foi feita primeiramente por meio do padrão de digestão dos plasmídeos extraídos, com enzimas de restrição específicas, PCR confirmatória e depois seqüenciamento do plasmídeo.

6.2 Confirmação dos genes por digestão enzimática

Bactérias *E. coli* DH5 α quimicamente competentes foram transformadas com o vetor pCDH contendo os genes do ZIKV, e quatro a seis clones foram selecionados da placa para a preparação de DNA plasmidial. Os DNAs plasmidiais contendo os insertos prM, Env e NS5 obtidos foram submetidos à clivagem sequencial com as enzimas *NheI* e *NotI*, enquanto os plasmídeos Cap, NS1, NS2A, NS2A, NS3, NS4A, NS4B sofreram digestão enzimática com *BamHI* e *XbaI*. posteriormente os produtos das reações da digestão foram migrados em gel 1% de agarose. O DNA extraído foi enzimaticamente clivado para conferir a identidade dos genes de interesse, por meio de migração eletroforética em gel 1% de agarose. Todos os clones liberaram fragmentos de tamanho esperado, confirmando o sucesso das estratégias de clonagem dos vetores (**Figuras 17 e 18**)

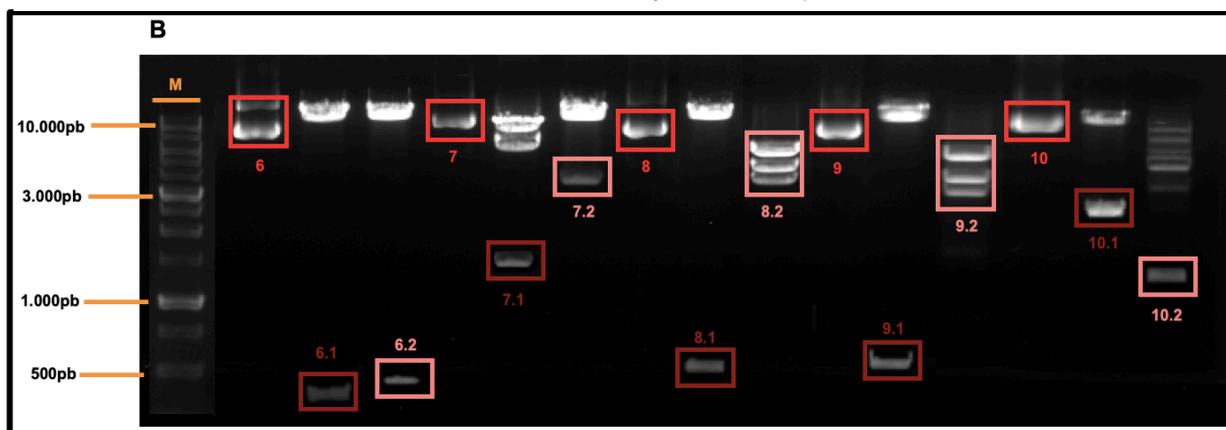
Figura 17- Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do DNA dos clones E, prM, Cap, NS1 e NS2A, selecionados para verificação dos insertos



Fonte: O Autor, (2019).

Legenda: 1, 2, 3, 4, 5- construções pCDH-E, pCDH-prM, pCDH-Cap, pCDH-NS1, pCDH-NS2A, respectivamente, não digeridas; 1.1 - construção pCDH-E digerida com as enzimas de clonagem *NotI* e *NheI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7354 e 1519pb correspondente ao vetor e ao inserto; 1.2- construção pCHD-E digerida com enzima confirmatória *XbaI* apresentou as bandas com tamanho 8046 e 827pb; 2.1- construção pCDH-prM digerida com as enzimas de clonagem *NotI* e *NheI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7354 e 511pb correspondente ao vetor e ao inserto; 2.2- construção pCHD-prM digerida com enzima confirmatória *XbaI* apresentou as bandas com tamanho 7583 e 282pb; 3.1 - construção pCDH-Cap digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 372pb correspondente ao vetor e ao inserto; 3.2- construção pCHD-Cap digerida com enzima confirmatória *BglII* apresentou as bandas com tamanho 3424, 2288 e 1910pb; 4.1- construção pCDH-NS1 digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 1062pb correspondente ao vetor e ao inserto; 4.2- construção pCHD-NS1 digerida com enzima confirmatória *Sall* apresentou as bandas com tamanho 6597 e 1822; 5.1- construção pCDH-NS2A digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 684pb correspondente ao vetor e ao inserto; 5.2- construção pCHD-NS2A digerida com enzima confirmatória *SphI* apresentou as bandas com tamanho 5539 e 2502; **M**– Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*New England Biolabs*®) gel de 1% agarose corado com brometo de etídio. **M**– Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*New England Biolabs*®) gel de 1% agarose corado com brometo de etídio.

Figura 18- Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do DNA dos clones NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 selecionados para verificação dos insertos.



Fonte: O autor, (2019).

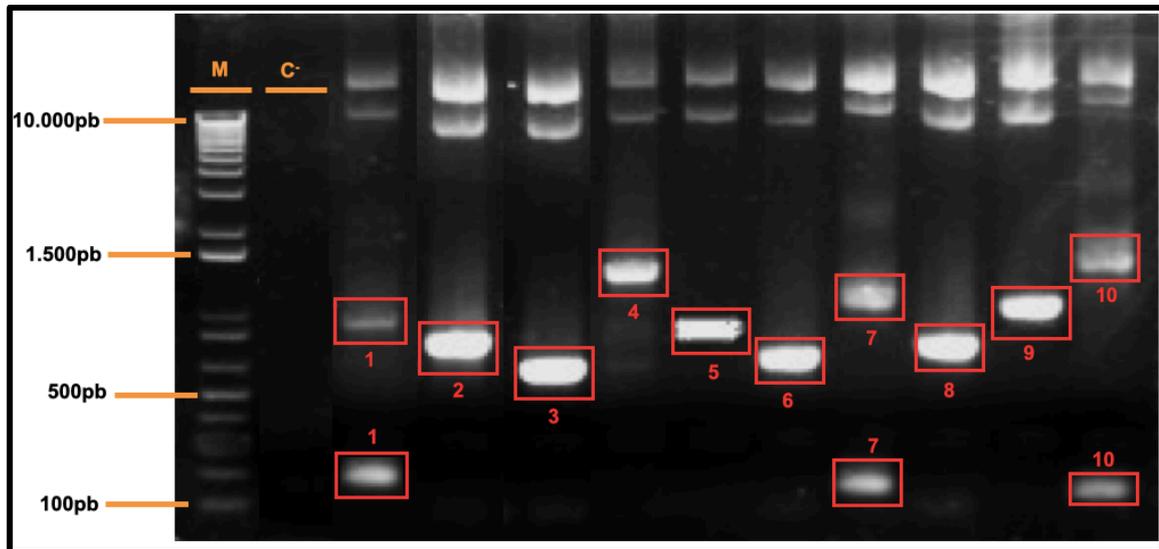
Legenda: **6, 7, 8, 9, 10-** construções pCDH-NS2B, pCDH-NS3, pCDH-NS4A, pCDH-NS4B e pCDH-NS5, respectivamente, não digeridas; **6.1-** construção pCDH-NS2B digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 396pb correspondente ao vetor e ao inserto; **6.2-** construção pCHD-NS2B digerida com enzima confirmatória *PstI* apresentou as bandas com tamanho 7501 e 252pb; **7.1-** construção pCDH-NS3 digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 1851pb correspondente ao vetor e ao inserto; **7.2-** construção pCHD-prM digerida com enzima confirmatória *SphI* apresentou as bandas com tamanho 5676 e 3538pb; **8.1** - construção pCDH-NS4A digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 456pb correspondente ao vetor e ao inserto; **8.2-** construção pCHD-NS4A digerida com enzima confirmatória *BglII* apresentou as bandas com tamanho 3424, 2409 e 1873pb; **9.1-** construção pCDH-NS4B digerida com as enzimas de clonagem *BamHI* e *XbaI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7357 e 759pb correspondente ao vetor e ao inserto; **9.2-** construção pCHD-NS4B digerida com enzima confirmatória *SacI* apresentou as bandas com tamanho 3424, 2089 e 1754; **10.1-** construção pCDH-NS5 digerida com as enzimas de clonagem *NheI* e *NotI*, a digestão dos clones com as enzimas apresentou as bandas com tamanho 7354 e 2718pb correspondente ao vetor e ao inserto; **10.2-** construção pCHD-NS2A digerida com enzima confirmatória *XbaI* apresentou as bandas com tamanho 8504 e 2718; **M-** Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*New England Biolabs*®) gel de 1% agarose corado com brometo de etídio.

6.2.1 Amplificação dos insertos do ZIKV por PCR

Por meio da técnica de PCR, utilizando os *primers* desenhados especificamente para esta reação, foi possível amplificar os genes do ZIKV inseridos nos vetores a partir de DNA plasmidial extraído de DH5 α clonadas com os vetores, com o resultado da reação de PCR analisado por corrida de eletroforese em gel 1% de agarose. A reação de PCR amplificou fragmentos de tamanhos específicos para cada gene (**Figura 19**), conforme esperado para as sequências do gene depositadas no *GenBank*, utilizadas nas análises de bioinformática e para o desenho dos *primers*. O controle negativo (C⁻) desta reação, no qual foi utilizado água milli-Q estéril ao invés de DNA molde, não mostrou nenhum sinal de amplificação, mostrado na figura 19. É

possível observar que os genes foram amplificados de forma específica e com bom rendimento.

Figura 19- Perfil da corrida eletroforética dos produtos da reação de amplificação do vetores contendo os insertos do ZIKV usando os primers desenhados para o sequenciamento



Fonte: O Autor, (2019).

Legenda: **1-** Produto da reação de amplificação do gene E inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, InterE-F e Inter-R, a reação apresentou bandas com tamanho 1708 e 185pb; **2-** Produto da reação de amplificação do gene prM inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou banda com tamanho 700pb correspondente ao tamanho do gene; **3-** Produto da reação de amplificação do gene Cap inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou banda com tamanho 564pb correspondente ao tamanho do gene; **4-** Produto da reação de amplificação do gene NS1 inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou banda com tamanho 1254pb correspondente ao tamanho do gene; **5-** Produto da reação de amplificação do gene NS2A inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou bandas com tamanho 876pb correspondente ao tamanho do gene; **6-** Produto da reação de amplificação do gene NS2B inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou banda com tamanho 588pb correspondente ao tamanho do gene; **7-** Produto da reação de amplificação do gene NS3 inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, InterNS3-F e InterNS3-R a reação apresentou bandas com tamanho 2049 e 135pb; **8-** Produto da reação de amplificação do gene NS4A inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou banda com tamanho 648pb correspondente ao tamanho do gene; **9-** Produto da reação de amplificação do gene NS4B inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, a reação apresentou banda com tamanho 951pb correspondente ao tamanho do gene; **10-** Produto da reação de amplificação do gene NS5B inserido no vetor usando os pares de *primers* pCDH-F, pCDH-R, InterNS5-F e InterNS5-R, a reação apresentou bandas com tamanho 2970 e 113pb; **C-** Controle negativo da reação, não foi adicionado nenhum DNA molde; **M-** Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*®) gel de 1% agarose corado com brometo de etídio.

6.2.2 Sequenciamento dos genes ZIKV

Os DNA plasmidiais extraídos dos clones transformantes foram sequenciados nos dois sentidos usando os *primers* descritos na **Tabela 3**. As sequências obtidas e

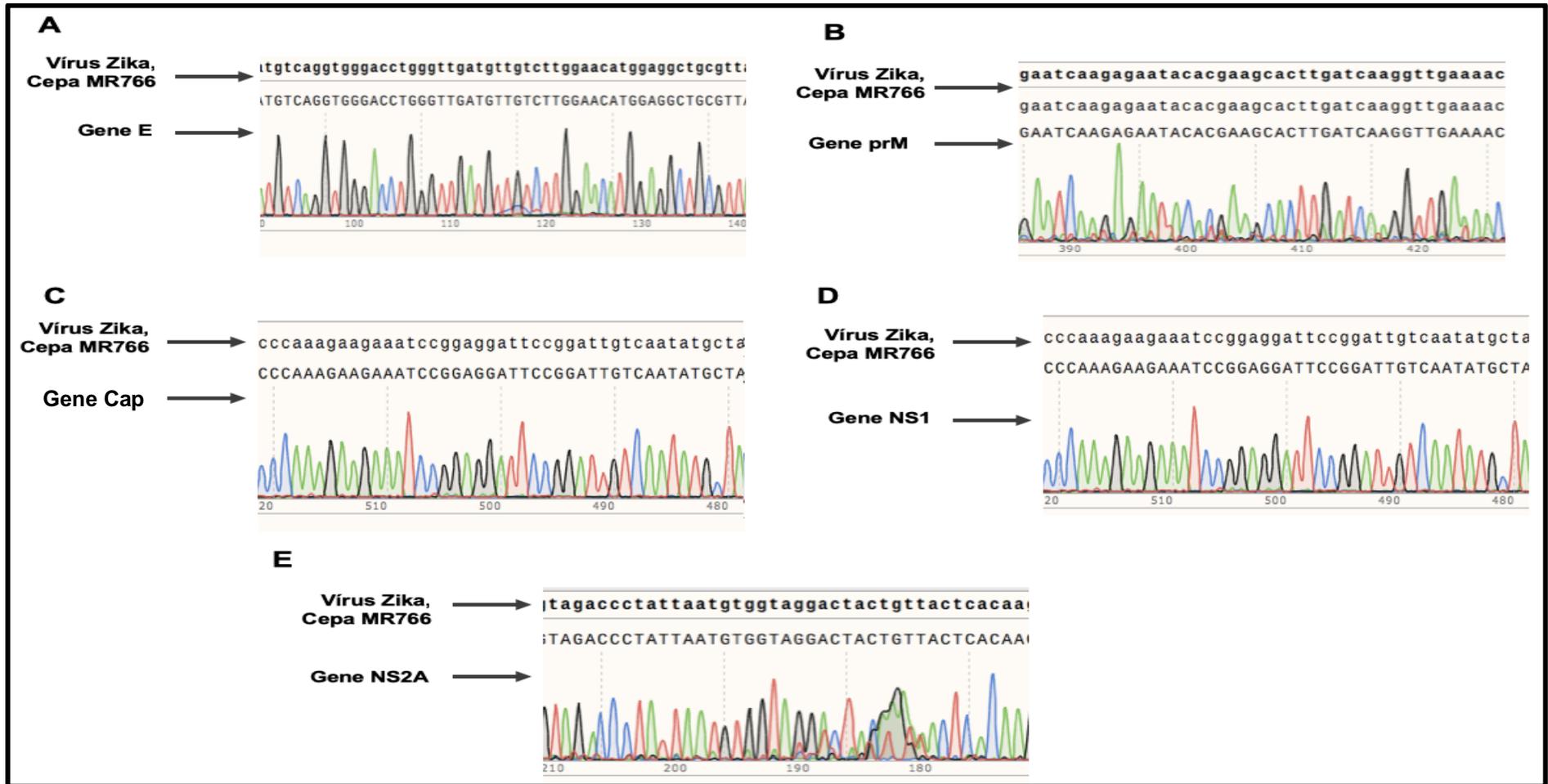
alinhas por meio do programa *SnapGene* resultaram em uma sequência consenso. As análises pós sequenciamento dos nucleotídeos dos dez vetores revelaram índice de similaridade = 100% (**Quadro 5**) das sequências do estudo com sequências depositadas no banco de dados do *GeneBank*, confirmando, portanto, que os vetores possuem os genes do ZIKV, cepa africana (MR766) (**Figuras 20 e 21**) clonados no seu sítio de clonagem.

Quadro 5- Identidade encontrada entre a sequência nucleotídeos dos genes do ZIKV inseridos nos vetor pCDH e dados genéticos disponíveis no GenBank por meio do programa BlastX

Sequência	Inserto	Identidade
Virus Zika, cepa MR766, genoma completo	E	100%
	prM	100%
	Cap	100%
	NS1	100%
	NS2A	100%
	NS2B	100%
	NS3	100%
	NS4A	100%
	NS4B	100%
NS5	100%	

Fonte: O Autor, (2019).

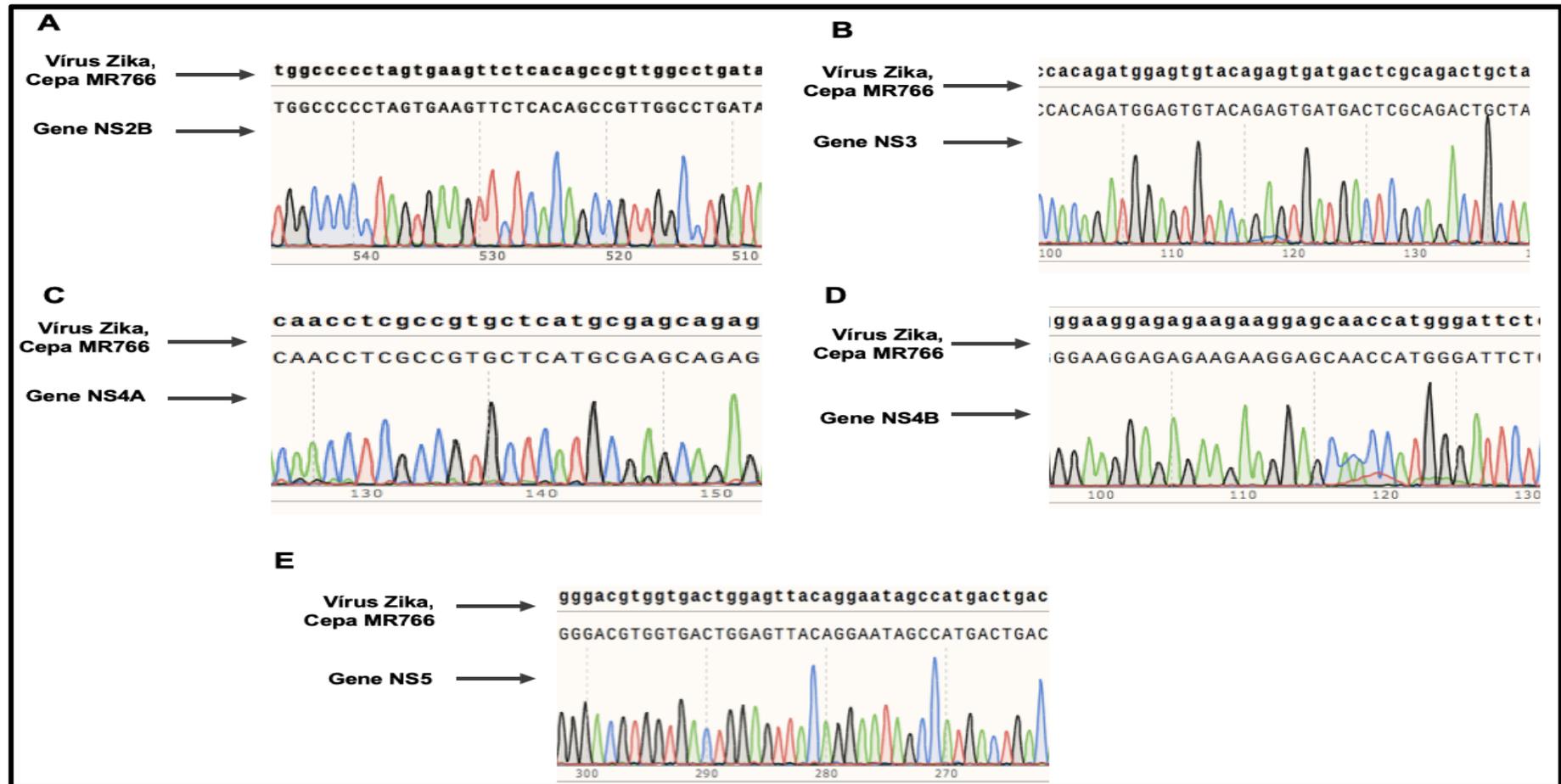
Figura 20- Eletroferograma parcial do sequenciamento dos genes E, prM, Cap, NS1 e NS2A



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: **A-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene E inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F, pCDH-R, InterE-F e Inter-R; **B-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene prM inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R; **C-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene Cap inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R; **D-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS1 inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R; **E-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS2A inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R.

Figura 21- Eletroferograma parcial do sequenciamento dos genes NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: **A-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS2B inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R; **B-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS3 inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F, pCDH-R, InterNS3-F e InterNS3-R; **C-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS4A inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R; **D-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS4B inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F e pCDH-R; **E-** Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS5 inserido no vetor pCDH usando os *primers* pCDH-F, pCDH-R, InterNS5-F e InterNS5-R.

6.3 Padronização das transfecções em células neuronais

Visto que as células SH-SY5Y são células extremamente sensíveis a perturbações ao seu ambiente de cultivo e hoje em dia existem vários métodos de transferência gênica, para a padronização inicial dos experimentos foram testadas diferentes concentrações de DNA e do agente de transfecção para dar continuidade ao estudo. Para esses experimentos, otimizou-se a transfecção nas SH-SY5Y por meio do emprego de um vetor plasmidial (pMEG) contendo o gene que codifica a proteína GFP. Esta estratégia foi adotada por facilitar a identificação das células transfectadas, observando-se a fluorescência da proteína GFP por meio da citometria de fluxo ou em microscópio de fluorescência.

A princípio foi utilizado a lipofecção das células SH-SY5Y com o agente de transfecção lipofectamina 3000, neste caso, por complexos contendo diferentes quantidades de plasmídeo pMEG (0,5, 1 e 2 μ g) e do agente de transfecção nos volumes 2 e 3 μ L. Para verificar as possíveis alterações morfológicas decorrentes da transfecção com lipofectamina avaliou-se a aparência das células em cultura, observadas em microscópio de luz. De maneira geral, quando as células foram observadas em microscópio elas apresentaram tapete homogêneo, com poucas células no sobrenadante e nenhuma alteração em sua morfologia, indicando que a lipofectamina nos volumes de 2 e 3 μ L não apresenta citotoxicidade.

A proporção de células fluorescentes foi avaliada após 24 e 48 horas, em microscópio de fluorescência e por citometria de fluxo. Houve detecção de fluorescência em todos os grupos transfectados (**Figuras 22, 23, 24 e 25**), sendo os melhores resultados obtidos por meio da utilização de 1 μ g de plasmídeo pMEG em 2 μ L de lipofectamina após 48 horas pós transfecção. Após 24 e 48 horas pós transfecção os resultados obtidos mostraram que a transfecção com este vetor plasmidial foi funcional, pois expressou eficientemente a proteína GFP em todos os grupos, observando-se que em, algumas condições, cerca de 60% das células foram transfectadas. No grupo após 24h de transfecção a porcentagem de células transfectadas variou de 8 – 42% (**Figura 22 e 23**) e no grupo de 48 horas pós transfecção a expressão de GFP nas células positivas variou de 2 – 60% (**Figura 24 e 25**) (**Tabela 1**). Observa-se também que não houve variação significativa nos grupos. Portanto, baseado nesses resultados prévios e em dados da literatura, nos

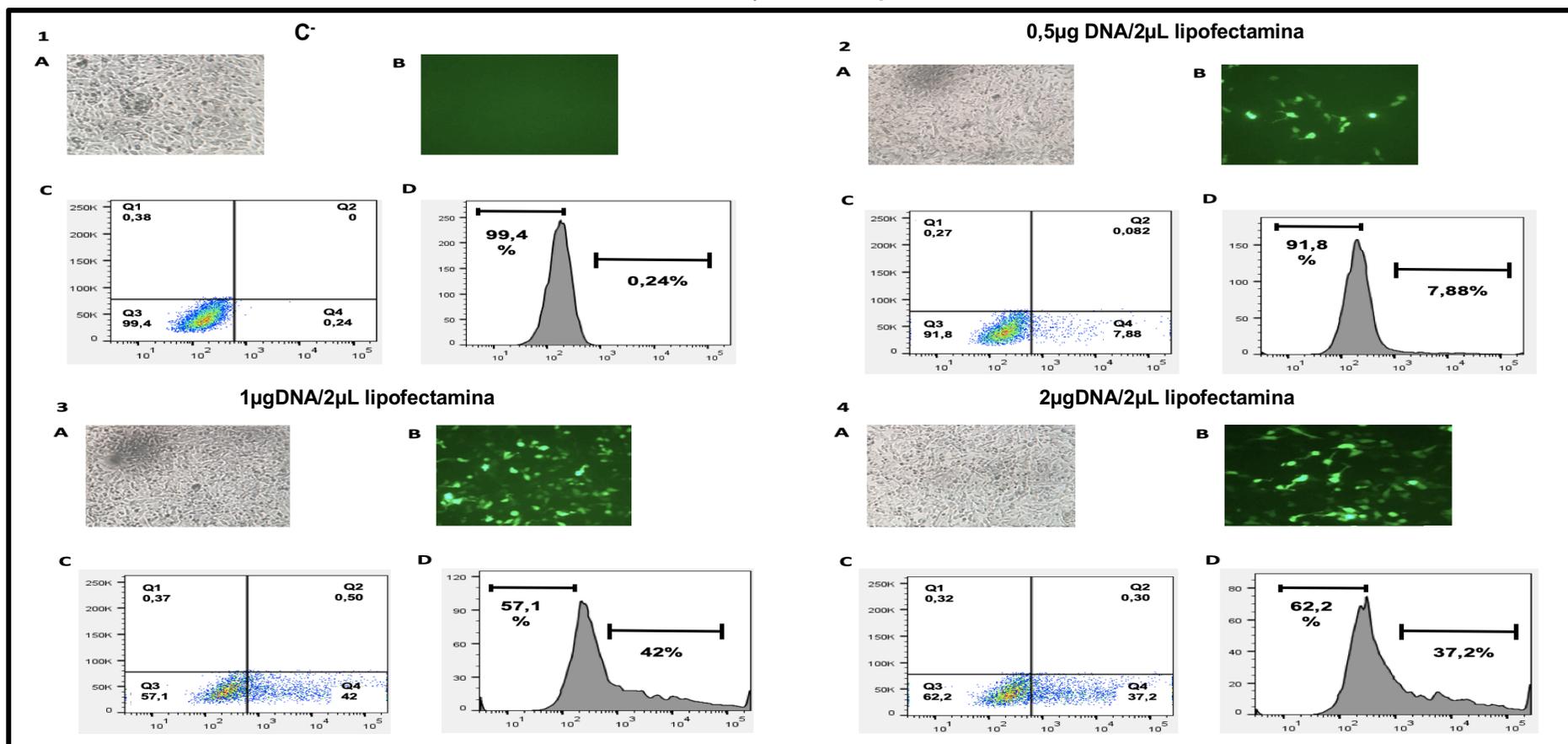
experimentos seguintes de transfecção em SH-SY5Y priorizou-se o uso das concentrações de DNA de 1 μ g e 2 μ L de lipofectamina.

Tabela 1- Eficiência da transfecção para cada condição testada na padronização

Quantidade DNA (μg)	Volume Lipofectamina (μL)	Período pós transfecção (h)	Porcentagem de células transfectadas (%)
0 μ g	2 μ L	24h	0,24%
0,5 μ g			7,88%
1 μ g			42%
2 μ g			37,2%
0 μ g	3 μ L	24h	0,44%
0,5 μ g			1,88%
1 μ g			41,2%
2 μ g			38,1%
0 μ g	2 μ L	48h	1,18%
0,5 μ g			12,6%
1 μ g			60,2%
2 μ g			51,3%
0 μ g	3 μ L	48h	1,10%
0,5 μ g			2,34%
1 μ g			33,1%
2 μ g			49,2%

Fonte: O Autor, (2019)

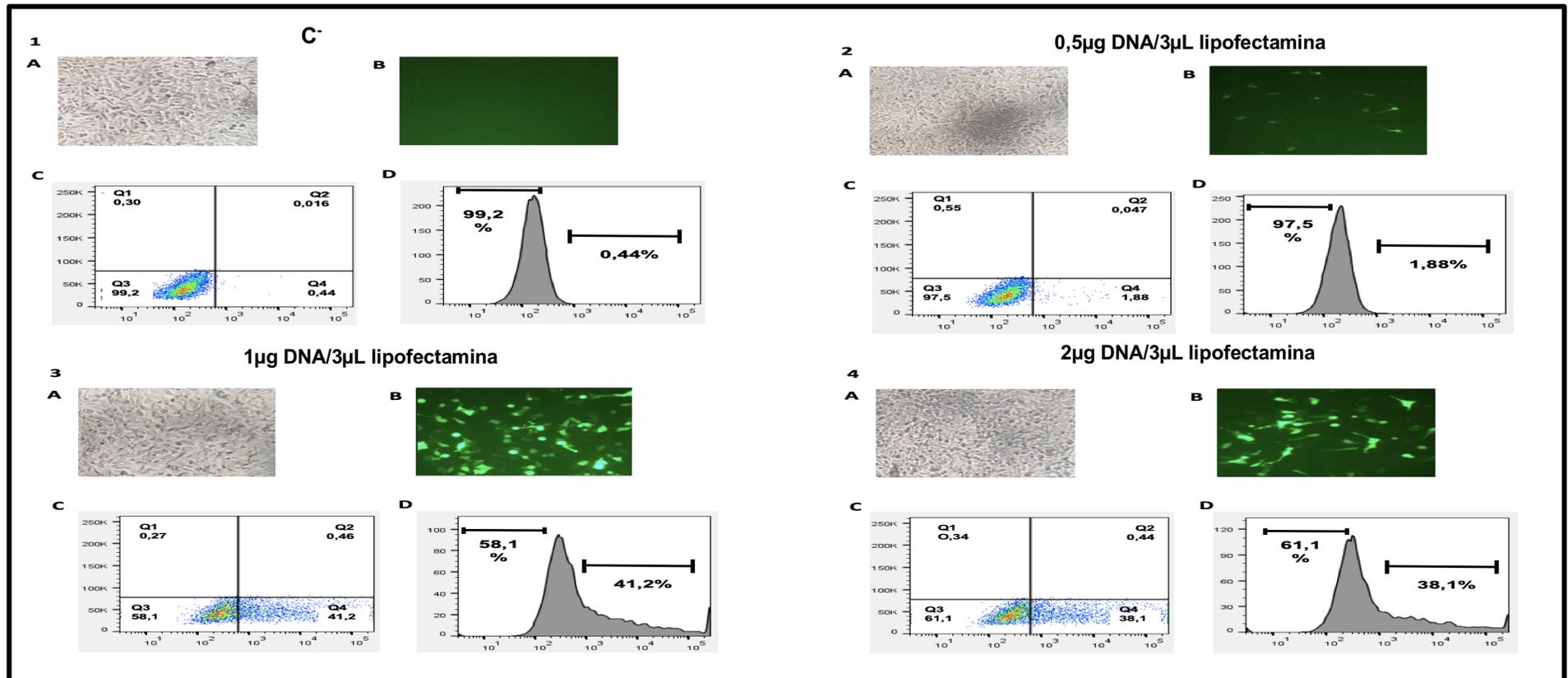
Figura 22- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 2 μ L de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 24 horas pós-transfecção.



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: 1- Grupo controle (sem DNA e lipofectamina) **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células neuronais. 2- Transfecção com 0,5µg DNA e 2µL lipofectamina. **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 3- Transfecção com 1µg DNA e 2µL lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* representativo da porcentagem das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 4- 2µg DNA e 2µL lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* da porcentagem das da porcentagem de transfecção das células neuronais; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células.

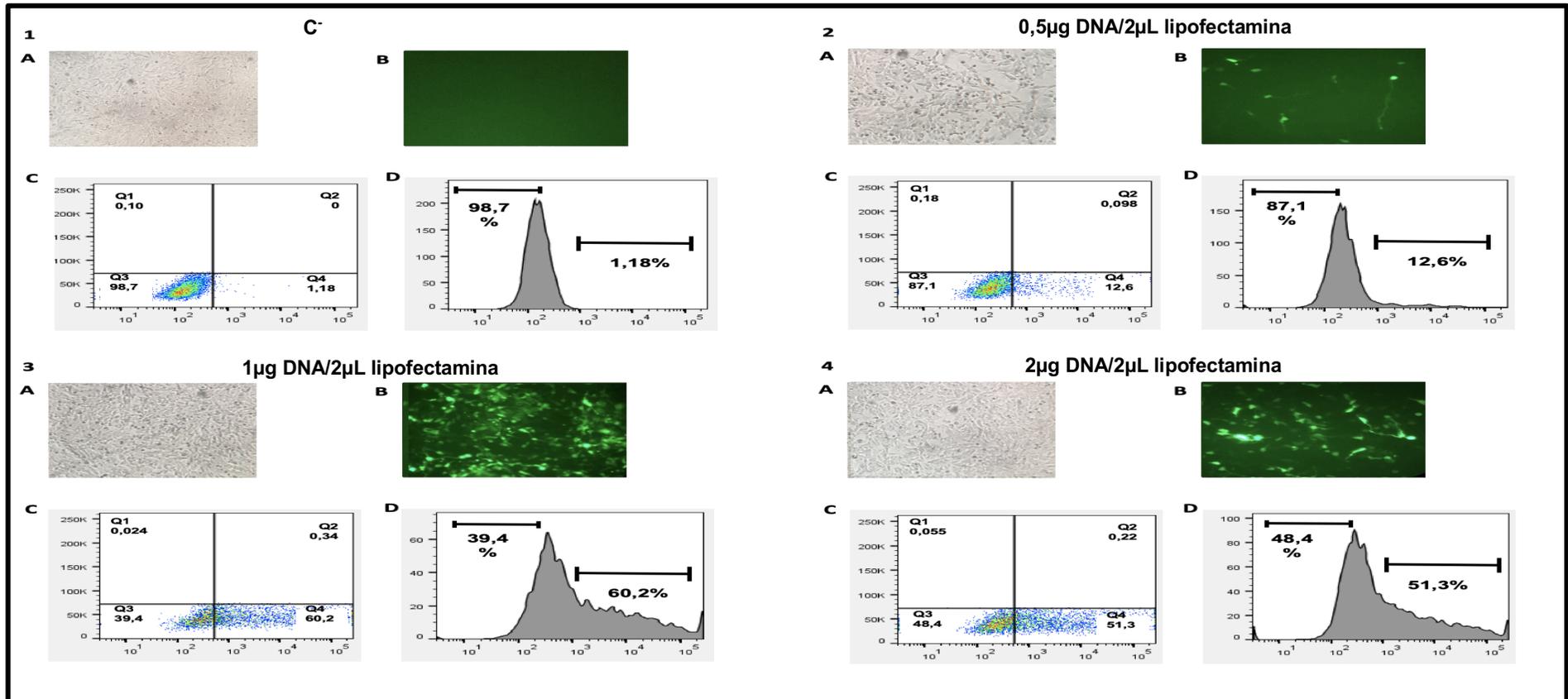
Figura 23- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 3 μ L de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 24 horas pós-transfecção.



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: 1- Grupo controle (sem DNA e lipofectamina) **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células neuronais. 2- Transfecção com 0,5 μ g DNA e 3 μ L lipofectamina. **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 3- Transfecção com 1 μ g DNA e 3 μ L lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* representativo da porcentagem das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 4- 2 μ g DNA e 3 μ L lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C-** *Dotplot* da porcentagem das da porcentagem de transfecção das células neuronais; **D-** Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células.

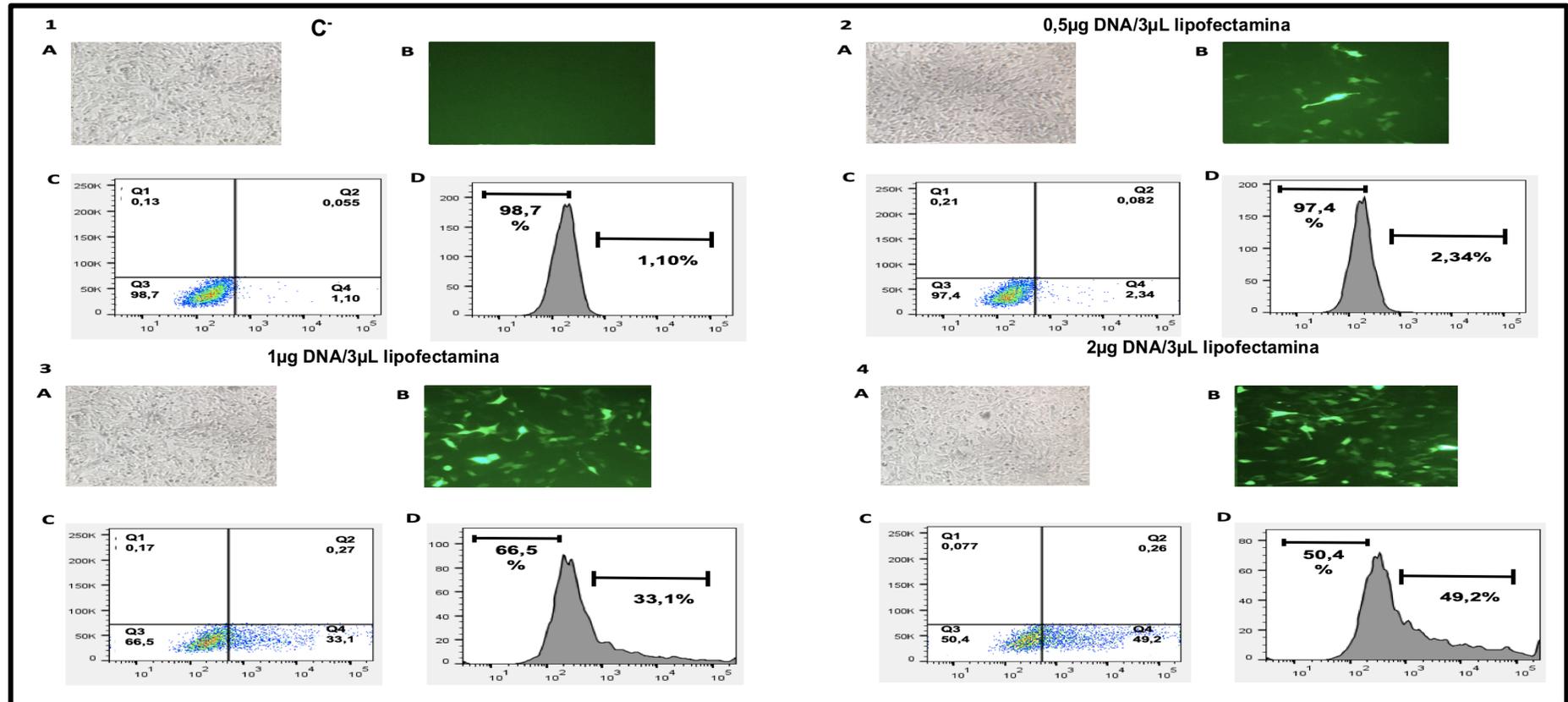
Figura 24- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 2 μ L de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 48 horas pós-transfecção.



Fonte: O Autor, 2019

Legenda. 1- Grupo controle (sem DNA e lipofectamina) **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células neuronais. 2- Transfecção com 0,5 μ g DNA e 2 μ L lipofectamina. **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 3- Transfecção com 1 μ g DNA e 2 μ L lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* representativo da porcentagem das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 4- 2 μ g DNA e 2 μ L lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* da porcentagem das da porcentagem de transfecção das células neuronais; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células.

Figura 25- Padronização da transfecção com o vetor pMEG, pelo método de lipofecção, com 3µL de lipofectamina em linhagem celular SH-SY5Y, 48 horas pós-transfecção



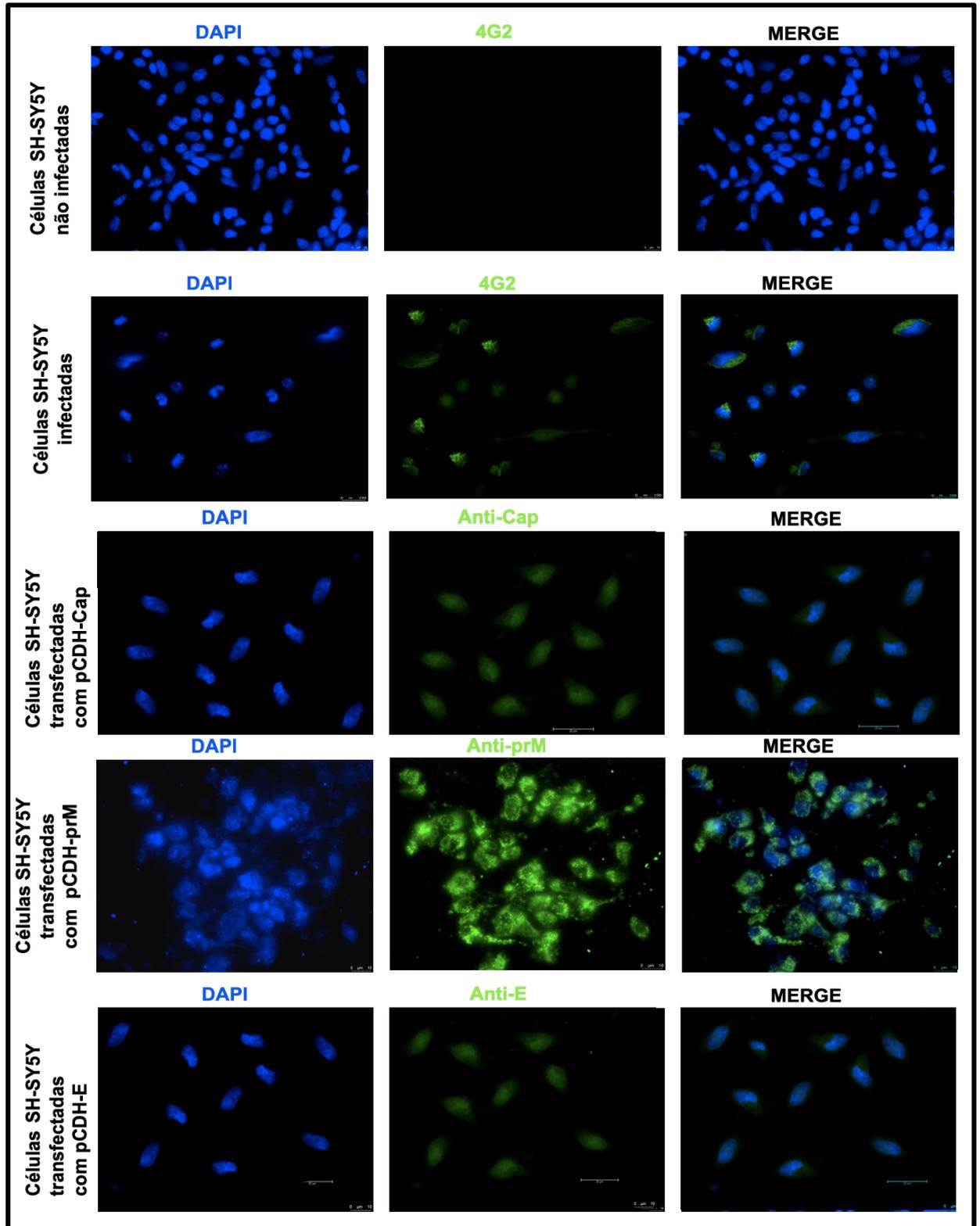
Fonte: O Autor, 2019

Figura 25. 1- Grupo controle (sem DNA e lipofectamina) **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células neuronais. 2- Transfecção com 0,5µg DNA e 3µL lipofectamina. **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* representativo das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 3- Transfecção com 1µg DNA e 3µL lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* representativo da porcentagem das células transfectadas com vetor pMEG-GFP; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células. 4- 2µg DNA e 3µL lipofectamina **A** e **B** – fotografias de microscopia em microscópio invertido e de fluorescência. As imagens da esquerda foram tiradas com a luz branca e da direita com a luz fluorescente no filtro L5; **C**- *Dotplot* da porcentagem das da porcentagem de transfecção das células neuronais; **D**- Histograma indicativo da porcentagem de transfecção das células.

6.4 Imunofluorescência indireta confirmatória da transfecção das células SH-SY5Y

A transfecção das células SH-SY5Y usando os plasmídeos pCDH contendo os genes do ZIKV foi testada por meio de ensaios de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos específicos para cada proteína, quanto ao reconhecimento das proteínas em cultura de células neuronais transfectadas. Os oito plasmídeos foram testados (E, prM, Cap, NS1, NS2B, NS3, NS4B e NS5) para comprovar a capacidade do anticorpo de reagir com as proteínas do ZIKV, o ensaio não foi realizado com as proteínas NS2A e NS4A por não haver anticorpos específicos disponíveis comercialmente. A expressão de Env, prM, Cap, NS1, NS2B, NS3, NS4B e NS5 foram confirmadas por imunofluorescência indireta 48h pós-transfecção. Nas células SH-SY5Y os anticorpos foram capaz de reconhecer as proteínas virais, demonstrando dessa maneira que a transfecção nessa linhagem celular usando o vetor pCDH foi eficiente, além disso, os resultados revelaram que estas proteínas foram expressas e localizadas no núcleo e no citoplasma de células SH-SY5Y transfectadas (**Figura 26**).

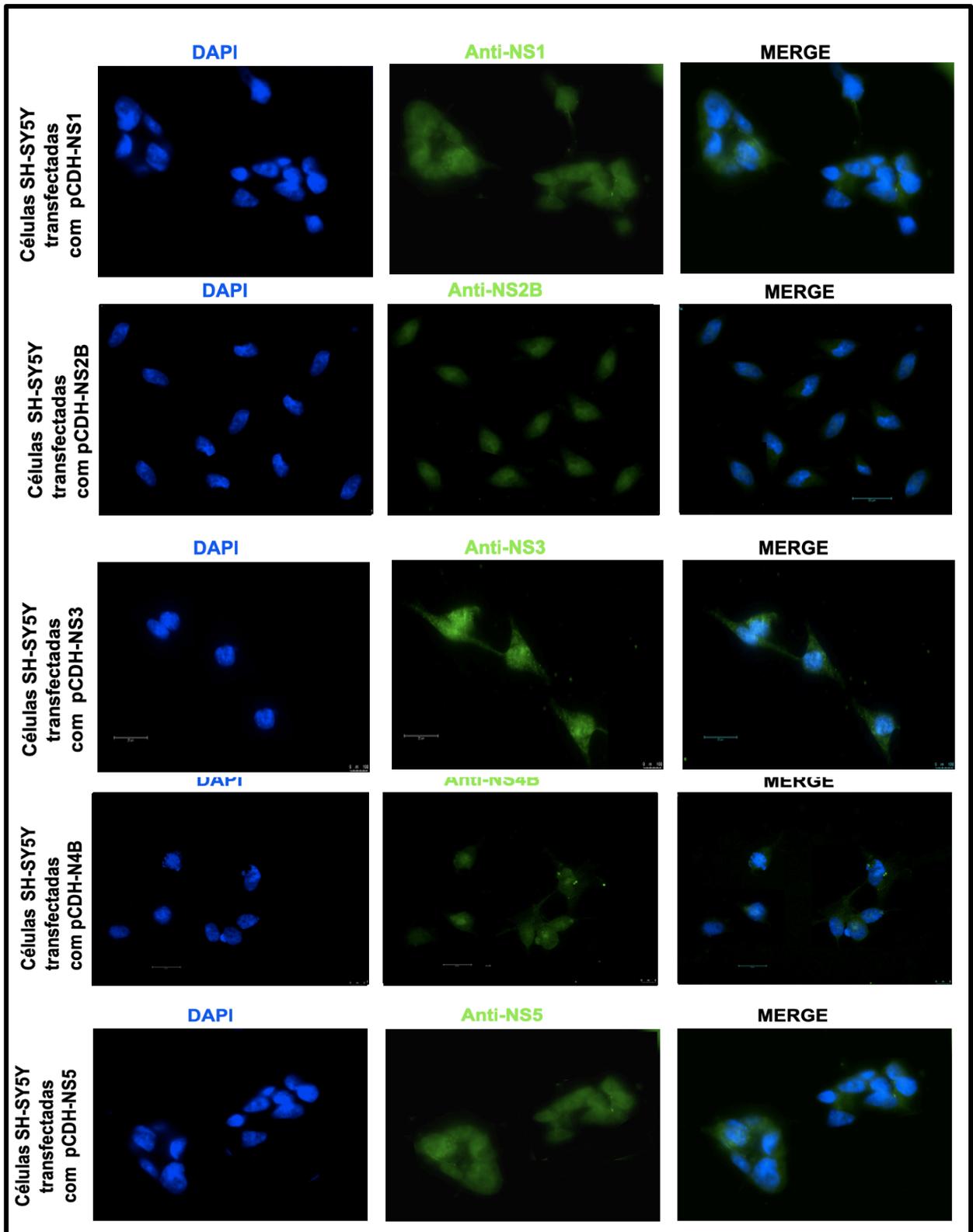
Figura 26- Imunofluorescência indireta para ZIKV e suas proteínas em células SH-SY5Y usando os anticorpos anti-E, anti-prM, anti-Cap



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: Marcação por imunofluorescência em células SH-SY5Y não infectadas e infectadas com ZIKV e transfectadas com E, prM e Cap 48h pós transfecção. As três colunas dentro de cada um dos 15 painéis correspondem a marcação com o corante DAPI para marcação do núcleo celular ("DAPI", marcação em azul, primeira coluna); marcação com anticorpos monoclonais específicos para a proteínas do envelope de flavivírus e para as proteínas E, prM e Cap respectivamente (4G2, Anti-E, Anti-prM e Anti-Cap, marcação em verde, segunda coluna); e a imagens sobrepostas ("MERGE" terceira coluna).

Figura 27- Imunofluorescência indireta para as proteínas do ZIKV em células SH-SY5Y usando os anticorpos anti-NS1, anti-NS2B, anti-NS3, anti-NS4B e anti-NS5



Fonte: O Autor, 2019

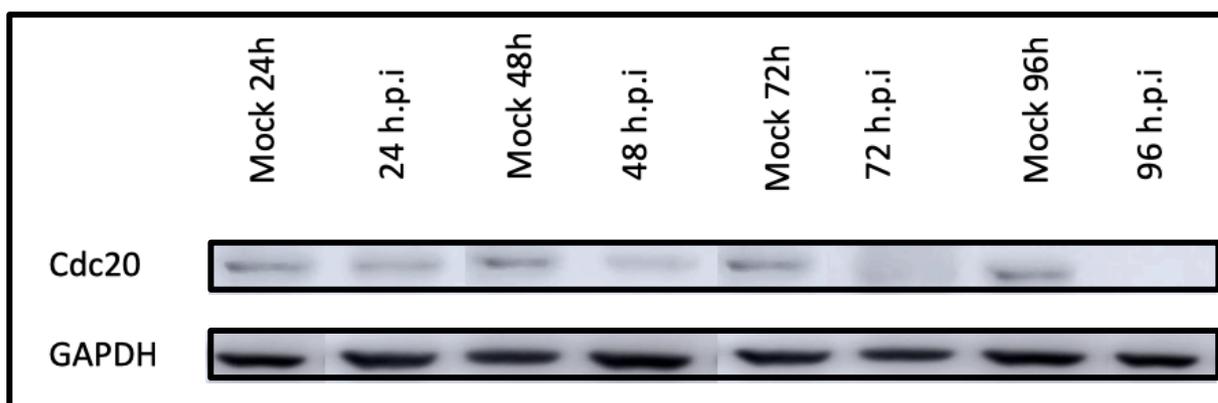
Legenda: Marcação por imunofluorescência em células SH-SY5Y transfectadas com NS1, NS2B, NS3, NS4B e NS5 48h pós transfecção. As três colunas dentro de cada um dos 15 painéis correspondem a uma marcação com o corante DAPI para marcação do núcleo celular ("DAPI", marcação em azul, primeira coluna); marcação com anticorpos monoclonais específicos para as proteínas NS1, NS2B, NS3, NS4B e NS5 respectivamente (Anti-NS1, Anti-NS2B, Anti-NS3, Anti-NS4B, Anti-NS5, marcação em verde, segunda coluna); e a imagens sobrepostas ("MERGE" terceira coluna).

As amostras proteicas utilizadas foram de 40ug para cada grupo, assim, com quantidades totais idênticas, pôde-se comparar a expressão da Cdc20 nas células infectadas e transfectadas.

Os sobrenadantes e as células foram recolhidos às 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção para avaliar a expressão de Cdc20 em células SH-SY5Y infectadas utilizando análises de *Western blot*. Os resultados mostraram que a Cdc20 é expressa nas primeiras 24 horas pós-infecção em lisados celulares (**Figura 28**). Enquanto a infecção prossegue, é possível observar que há diminuição na expressão da proteína Cdc20 e no período de 96h pós-infecção, nenhuma detecção de Cdc20 foi observada no lisado celular (**Figura 28**), enquanto a expressão de Cdc20 permanece inalterada no grupo não infectado. Esse resultado sugere que o ZIKV, de alguma maneira, após 48 hpi já começa a reduzir a expressão de Cdc20.

Para examinar o efeito das proteínas de ZIKV na expressão de Cdc20, realizou-se *Western blot* para verificar a expressão proteica de Cdc20 após 48 horas de transfecção. Os resultados mostraram que as células transfectadas com o plasmídeo E e prM apresentaram diminuição significativa na expressão do Cdc20 enquanto nos demais grupos (Cap, NS1, NS2B, NS3 e NS4B) não houve alteração significativa na expressão proteica.

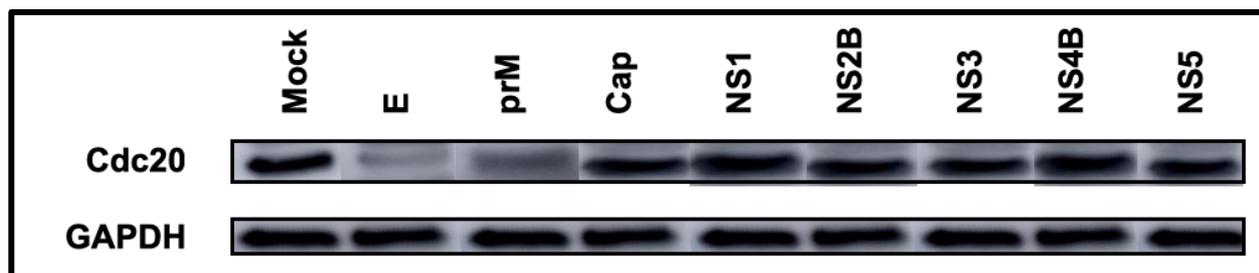
Figura 28- Análise da expressão da proteína Cd20 em células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: Análise da expressão da proteína Cdc20, por *western blot*, em células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV por 24,48, 72 e 96h. A normalização da intensidade das bandas foi realizada usando os níveis na proteína GAPDH como controle endógeno.

Figura 29- Análise da expressão da proteína Cdc20 em células SH-SY5Y transfectadas com plasmídeos do ZIKV



Fonte: O Autor, 2019

Legenda: Análise da expressão da proteína Cdc20, por *western blot*, em células SH-SY5Y transfectadas com plasmídeos com os genes do ZIKV em 48h. A normalização da intensidade das bandas foi realizada usando os níveis na proteína GAPDH como controle endógeno.

6.1 Avaliação do perfil proliferativo das células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas

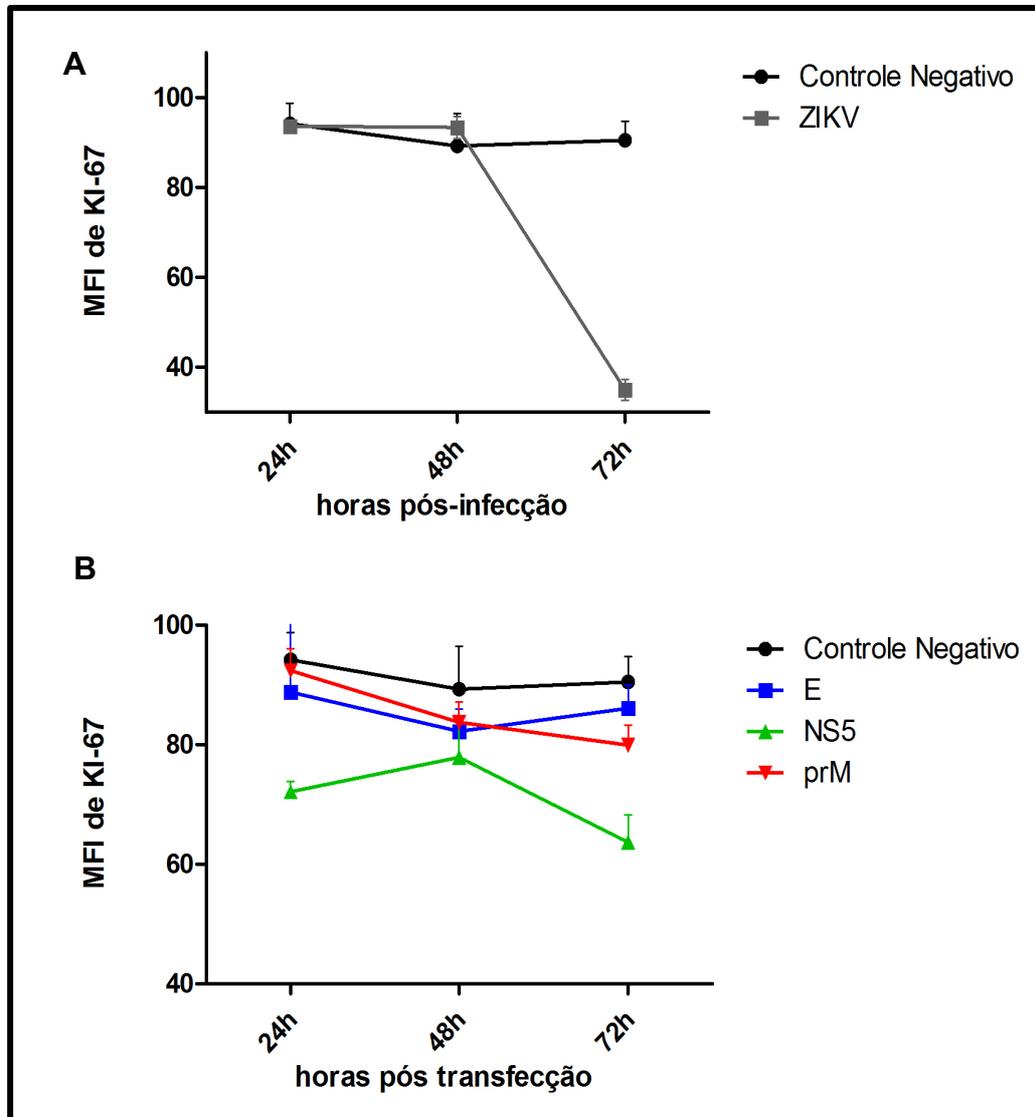
Para examinar o efeito da infecção com ZIKV ou da transfecção com pCDH-E, pCDH-prM e pCDH-NS5 sobre o perfil proliferativo das células SH-SY5Y foi realizada análise de citometria de fluxo com marcação específica para o Ki67, proteína nuclear utilizada como marcador de proliferação celular. Para tal, foram cultivadas $1,0 \times 10^5$ células/poço em placa de 24 poços e 24h após incubação em estufa as células foram infectadas/transfectadas. As células foram acompanhadas por quatro dias, de modo que a cada 24 hpi elas eram permeabilizadas, fixadas e marcadas com Ki67 e analisadas por citometria de fluxo, a fim de observar a taxa de proliferação pós infecção e transfecção. Os resultados do experimento são expressos em intensidade média de fluorescência (MFI) de Ki67.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 30A**, no período 72h pós infecção ocorre uma redução de aproximadamente de 50% na MFI das células infectadas, indicando que o vírus inibe a proliferação dessa linhagem celular.

A análise dos grupos transfectados no tempo de 48h revela que houve redução na MFI nos grupos E e prM. No último período analisado, 72h, observa-se que houve redução na MFI em todos os grupos estudados, podendo ressaltar a diminuição marcante na MFI no grupo NS5 (**Figura 30B**). Nenhuma das proteínas estudadas apresentou o mesmo perfil de inibição proliferativa tão evidente quanto o vírus *per se*, sugerindo que as três proteínas podem ter ação sinérgica sobre a capacidade

proliferativa ou então que as outras proteínas, não estudadas aqui, podem estar envolvidas também na redução da proliferação.

Figura 30- Perfil proliferativo de células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas



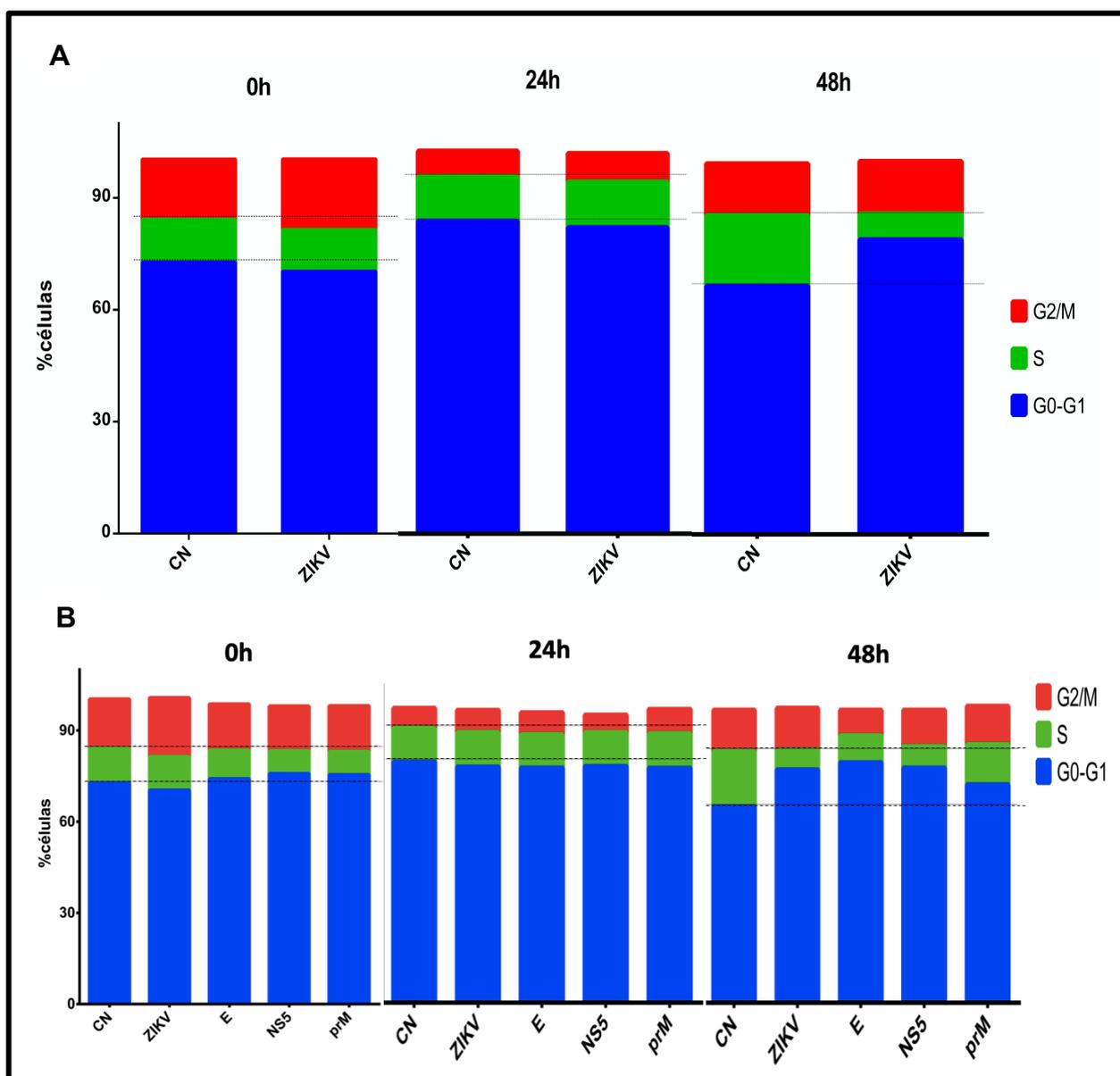
Fonte: O Autor, 2019

Legenda: Perfil proliferativo das células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas baseado na média de intensidade de fluorescência anticorpo monoclonal anti-Ki67 conjugado ao FITC. **A-** Perfil proliferativo do grupo de células não infectadas e grupo infectado com MOI de 1,0. **B-** Perfil proliferativo do grupo de células não infectadas e o grupo infectado com MOI de 1,0.

6.2 Avaliação do ciclo celular em células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas

Para avaliar o efeito da infecção com ZIKV ou da transfecção com pCDH-E, pCDH-prM e pCDH-NS5 sobre o perfil do ciclo celular nas células SH-SY5Y foi realizado análise de citometria de fluxo com o marcador específico PI. Para tal, foram cultivadas $1,0 \times 10^5$ células/poço em placa de 24 poços e 24h após incubação em estufa as células foram infectadas/transfectadas. As células foram acompanhadas por três dias, de modo que ao final do experimento as células foram fixadas e marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo, a fim de observar o ciclo celular de cada grupo. Os resultados do experimento são expressos em porcentagem de células em cada fase do ciclo celular: G0-G1, S e G2/M.

De acordo com os resultados obtidos não houve diferença significativa na proporção de células nas três fases do ciclo celular (G0-G1, S, G2/M) no período 0h pós infecção/ transfecção (**Figura 31A e 31B**). No período 24h a proporção das fases se mantém semelhante no grupos não infectados e infectado (**Figura 31A**). A mesma análise do mesmo período realizada nos grupos transfectados revela também que não houve alteração nas proporções de fases do ciclo (**Figura 31B**). As alterações no ciclo celular observadas por 48h mostram que houve aprisionamento de células na fases G0-G1 nos grupos infectados quando comparado com o grupo não infectado (**Figura 31A**), ocasionando uma redução na porcentagem de células na fase S. A análise dos grupos transfectadas também revelou uma diminuição de células na fase S ocasionada pelo aprisionamento de células na fase G0-G1, diferença marcante principalmente nos grupos E e NS5 em relação ao grupo não infectado. Na fase S também a diminuição se mostrou significativa para todos os grupos analisados em relação a porcentagem de células na mesma fase no controle negativo.

Figura 31- Perfil de ciclo celular de células SH-SY5Y infectadas ou transfectadas

Fonte: O Autor, 2019

Legenda: Análise do ciclo celular em células de linhagem SH-SY5Y, a marcação com PI e a análise por citometria de fluxo foram realizadas após 0h, 24h e 48h pós infecção/ transfecção. **A-** Perfil proliferativo das células SH-SY5Y não infectadas e infectadas com o ZIKV após 0h, 24h e 48h pós infecção. **B-** Perfil proliferativo das células SH-SY5Y não infectadas e infectadas com o ZIKV após 0h, 24h e 48h pós infecção, e células transfectadas com E, NS5 e prM após 0h, 24h e 48h pós transfecção. Nos dois gráficos em barra, a coluna em azul representa a porcentagem de células na fase G0-G1; a coluna em verde representa a porcentagem de células na fase S; as colunas em vermelho representa a porcentagem de células na fase G2/M

7 DISCUSSÃO

O ZIKV é um arbovírus emergente e ganhou repercussão internacional nos últimos anos se tornando um dos flavivírus mais estudados pela comunidade científica. Os recentes surtos epidêmicos na América Central e América do Sul e a inesperada associação entre a infecção pelo ZIKV com alterações neurológicas em recém-nascidos atraiu a atenção global sobre a necessidade de estudar e compreender os mecanismos de patogênese viral associados aos casos de Síndrome Congênita do Zika e possíveis mecanismos de intervenção terapêutica.

Apesar do enorme avanço no conhecimento a respeito do vírus, estudar o tropismo e o impacto do ZIKV sobre a biologia celular e como esses fatores comprometem o neurodesenvolvimento, é crucial para entender os mecanismos de neuropatogênese do vírus. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar uma possível via de interação entre as proteínas virais com a proteína Cdc20 caracterizando, dessa maneira, um potencial mecanismo que explicasse a capacidade do vírus em impedir a proliferação e amadurecimento de neurônios.

Já está bem documentado na literatura a capacidade do vírus em infectar e se replicar em células progenitoras neurais (LI *et al.*, 2016; MING *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016; ROTHAN *et al.*, 2018;) comprometendo funções vitais dessas células como diferenciação (DANG *et al.*, 2016; GARCEZ *et al.*, 2016; DEVHARE *et al.*, 2017; GABRIEL *et al.*, 2017) e proliferação celular (LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018) e levando à morte celular por apoptose (CUGOLA *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; SLOMNICKI *et al.*, 2017) e autofagia (LIANG *et al.*, 2016; CHIMAREL *et al.*, 2018). Em um estudo conduzido por Liang *et al.* (2016), os pesquisadores analisaram quais genes estavam *up* e *down*-regulados em células progenitoras neurais infectadas com o ZIKV e observaram uma redução significativa na expressão do gene Cdc20 confirmando, dessa maneira, que o vírus interfere no crescimento e diferenciação dessa linhagem celular.

Com o intuito de verificar quais proteínas virais poderiam estar envolvidas em diminuir a expressão da proteína Cdc20 foi realizado ensaios de transfecção com os vetores plasmidiais cedido por Liang *et al.* A primeira etapa do trabalho foi realizar uma caracterização molecular desses vetores para confirmar a identidade dos insertos. Em relação ao dados de caracterização dos plasmídeos pCDH foi possível confirmar que os mesmos apresentaram os genes do ZIKV clonados individualmente

nos sítios de clonagem dos vetores. Os dez vetores foram submetidos a digestão com enzimas endonucleases específicas e liberaram fragmentos com o tamanho esperado para cada gene de acordo com o esperado (**Figura 17 e 18**). Após a confirmação os vetores tiveram os insertos sequenciados e as sequências obtidas foram utilizada para buscar a homologia com a sequência depositada no BLAST, confirmando dessa maneira que os insertos são os genes do ZIKV, cepa africana (**Tabela 5**).

Ao realizar um processo de transfecção de DNA, um plasmídeo que contém um gene de interesse é eficientemente entregue às células de estudo. Após a entrega às células, o DNA plasmidial atinge o citoplasma e o gene é transcrito em sua proteína correspondente. Alguns dos principais objetivos ao realizar a transfecção de DNA é alcançar uma boa eficiência de transfecção, mantendo boa viabilidade celular. Por ser uma linhagem sensível e apresentar características semelhantes à neurônios (SHIPLEY *et al.*, 2016) as células SH-SY5Y não suportam qualquer método de transfecção de DNA exógeno. Dessa maneira algumas padronizações foram necessárias para transfectar as células SH-SY5Y por lipofecção utilizando o vetor plasmidial pMEG-GFP. O gene GFP foi escolhido pela sua facilidade em detectar as células transfectadas por meio da expressão de GFP, proteína fluorescente sem expressão endógena. A funcionalidade da técnica foi confirmada pela eficiente transfecção nas células dessa linhagem no qual foram avaliados os seguintes critérios: três concentrações de DNA (0,5, 1 e 2 μ g); dois volumes de lipofectamina (2 e 3 μ L); dois períodos pós transfecção (24 e 48h) para a padronização da técnica. Dentre os parâmetros analisados, observaram-se os melhores resultados com 1 μ g de DNA, 2 μ L de lipofectamina com 48h pós transfecção com aproximadamente 60% das células transfectadas (**Figura 24**).

Estabelecidas as condições de transfecção, partiu-se para transfecção utilizando os vetores com os insertos do ZIKV, que foi o real objetivo deste trabalho. Para confirmar a transfecção usando os plasmídeos pCDH foi realizado um ensaio de imunofluorescência para verificar a expressão das proteínas do ZIKV. Com os resultados da imunofluorescência, pode-se observar que a transfecção com o pCDH foi eficiente, pois houve expressão das proteínas virais em todos os grupos analisados (E, prM, Cap, NS1, NS2B, NS3, NS4B e NS5) (**Figura 26 e 27**) corroborando com resultados semelhantes obtidos por Liang *et al.* (2016).

Neste estudo com a finalidade de analisar o impacto do ZIKV nos níveis de Cdc20 foram realizados ensaios de infecção por quatro dias consecutivos. Nossos

resultados encontraram Cdc20 com expressão diminuída nas células SH-SY5Y infectadas. Analisando a membrana do *immunoblotting* é possível observar que após 48 hpi já ocorre uma diminuição da expressão proteica de Cdc20 obedecendo uma cinética inversamente proporcional com a infecção, ou seja, conforme a infecção avança nas células infectadas os níveis de Cdc20 diminuem com o passar do tempo atingindo níveis não detectados em 96 hpi, enquanto que a expressão de Cdc20 no grupo controle (células não infectadas) se mantém estável durante o mesmo período (**Figura 28**). Esse resultado se mostra em acordo com a literatura, onde Bennet *et al.* (2019) analisando dados de expressão gênica de células-tronco pluripotentes frente a infecção por ZIKV observaram níveis diminuído de Cdc20 e com outras proteínas relacionadas a regulação do ciclo celular e apoptose. Uma possível explicação para esta redução nos níveis de Cdc20 pode estar possivelmente relacionado com a downregulação do gene Cdc20 por proteínas do ZIKV, como já apontado por Liang *et al.* (2016). O Cdc20 é um ativador altamente conservado do complexo promotor de anáfase (APC), promovendo a ubiquitinação regulada pelo ciclo celular e a proteólise de vários alvos críticos de regulação do ciclo celular, incluindo securina e ciclinas mitóticas. A atividade da APC-Cdc20 é minuciosamente regulada, e essa regulação é provavelmente importante para o controle preciso do ciclo celular (ROBBINS *et al.*, 2010; IZAWA *et al.*, 2011). Já foi descrito na literatura que a infecção pelo ZIKV é um fator que desregula a mitose levando a desorganização estrutural, alterações cromossômicas e até mesmo morte celular (DANG *et al.*, 2016; GARCEZ *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; ONORATI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2019).

Os vetores pCDH que codificam as proteínas estruturais e não estruturais do ZIKV foram usados para transfectar as células SH-SY5Y e analisar a expressão de Cdc20 frente à expressão das proteínas virais. Decidiu-se usar para este ensaio o período de 48h, visto que no experimento anterior (**Figura 28**) observou-se que a partir de 48 hpi foi possível observar redução de Cdc20 em células SH-SY5Y infectadas. No experimento de transfecção, somente o grupo transfectado com os plasmídeos referentes às proteínas E e prM apresentaram diminuição significativa na expressão de Cdc20 (**Figura 29**). Em estudo anterior de Liu *et al.* (2018), usando vetores lentivirais recombinantes que codificam as proteínas estruturais truncadas do ZIKV (prM-Env, M-Env e Env) que foram transduzidos em células PCD12 mostrou que a superexpressão de proteína E causou upregulação de p53 e p21Cip1/Waf1 e diminuição nos níveis de ciclina B1. Estes resultados indicam que a proteínas

estruturais E e prM podem estar envolvida na desregulação da mitose, pela interação com outras proteínas do grupo das ciclinas envolvidas na organização do ciclo mitótico. Nossos resultados em concordância com de Liu indicam que a proteína E pode estar envolvida na interação com as proteínas celulares desregulando o mecanismos de controle do ciclo celular.

Diante dos resultados que mostraram possível interação das proteínas estruturais (E e prM) com o Cdc20, decidiu-se avaliar se essas proteínas eram capazes de alterar o perfil proliferativo das células SH-SY5Y. Para nossa surpresa, nenhuma das proteínas estruturais (E e prM) analisadas diminuíram significativamente a taxa proliferativa das células (**Figura 30B**). Os resultados que apresentaram significância estatística foram do grupo transfectado com a NS5 no 3º dia pós transfecção. Essa proteína não estrutural já descrita na literatura por estar envolvida em na interferência de outros processos celulares, principalmente relacionada com o antagonismo na via de interferon do tipo I (ZHAO et al., 2017; HERTZOG *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019), mas não diretamente relacionada a nenhum mecanismos de proliferação celular. Entretanto quando analisado a inibição da proliferação das proteínas (E, prM e NS5) com o vírus *per si*, observa-se que nenhuma delas é capaz de reduzir drasticamente a proliferação ao mesmo nível que o vírus (**Figura 30A**). Esse resultados sugerem que outras proteínas virais, além das citadas podem estar envolvidas ou a ação sinérgica dessas proteínas podem estar implicadas na redução da capacidade proliferativa, como demonstrado por Liu et al., 2018 ao usar lentivírus prM-Env e verificar que essas proteínas super expressas em conjunto ocasionam diminuição significativa na proliferação celular. Além disso esse resultado confirma a capacidade do vírus em inibir a proliferação celular em linhagens neuronais, como já descrito na literatura (LAEZAR *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016; ROSA-FERNANDES *et al.*, 2019).

Além de analisar se as proteínas do ZIKV interferiam com a proliferação das células SH-SY5Y, foi avaliado também o perfil de ciclo celular dessa linhagem quando transfectadas com os plasmídeos citado acima. Quando observado o experimento em 48h ocorre diminuição na porcentagem de células na fase S nos grupos infectados e transfectadas com E, NS5 e prM (**Figura 31A e 31B**), devido ao aprisionamento de células na fase G0-G1 do ciclo celular. Esses resultados reforçam ainda mais que o vírus perturba o ciclo celular (SOUZA *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016), por meio de interação de suas proteínas virais com as proteínas celulares envolvidas na

organização e controle da mitose (LIU *et al.*, 2018). Em relação ao aumento observada na fase G0-G1 provavelmente se deve ao fato do vírus ou suas proteínas comprometerem a passagem da fase G0-G1 para fase S diminuindo assim o número de células nas fases subsequentes. Esse resultado está de acordo com o experimento anterior de proliferação celular, (**Figura 29**), no qual foi possível observar que a partir de 48h o vírus e suas proteínas inibem a capacidade proliferativa das células SH-SY5Y.

Portanto, os resultados deste trabalho apontam que algumas proteínas virais interagem com proteínas celulares do hospedeiro perturbando o ciclo celular e consequentemente desregulando a proliferação celular. Esse dados podem indicar a relação entre a infecção pelo ZIKV e o comprometimento do desenvolvimento de células neuronais, o que em alguns casos, poderia explicar a neurocitotoxicidade do vírus. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer as implicações das proteínas do ZIKV sobre fatores de regulação do ciclo celular.

8 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do atual trabalho possibilitou analisar uma via de interação entre as proteínas virais do Zika com a proteína Cdc20 usando como modelo de infecção células neuronais e vetores plasmidiais contendo os genes do ZIKV, o que permite concluir:

- a) Em células SH-SY5Y infectadas ocorre diminuição da expressão de Cdc20 a partir do período de 48 pós infecção;
- b) As proteínas virais E e prM reduzem a expressão proteica de Cdc20, após 48 horas, em células SH-SY5Y transfectadas;
- c) O vírus reduz, em aproximadamente, 50% a capacidade proliferativa das células SH-SY5Y do segundo para o terceiro dia de infecção;
- d) As proteínas E, prM e NS5 reduzem a proliferação das células SH-SY5Y transfectadas, mas não de maneira tão marcante quanto o vírus;
- e) A infecção com ZIKV e a proteínas E, NS5 e prM reduzem a porcentagem de células na fase S devido ao aprisionamento de células na fase G0-G1 em 48h pós infecção/transfecção.

REFERÊNCIAS

- ABBINK, P. *et al.* Protective Efficacy of Multiple Vaccine Platforms Against Zika Virus Challenge in *Rhesus Monkeys*. **Science**, Nova Iorque, v. 353, n 6304, p. 1129–1132, 2016.
- ARAÚJO, T. V. B. *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova Iorque, v. 18, n. 3, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309917307272?via%3Dihub> Acesso em: 13 jan. 2019
- AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova Iorque, v. 16, n. 3, p. 278–279, 2016. Acesso em 24 de janeiro de 2018. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1473309916000736?token=415F7B5FF0A1DEF4E822906FA436F7BA43EB26EC970D6219E08868255613CC3141E0CCAEA38088B282809CEEF43D2C25> . Acesso em: 23 dez 2018
- BAEZ, C. F. *et al.* Analysis of worldwide sequence mutations in Zika virus proteins E, NS1, NS3 and NS5 from a structural point of view. **Molecular bioSystems.**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 122–131, 2017.
- BASILE, K. *et al.* Zika virus: what, where from and where to? **Pathology**, Surry Hills, v. 49, n. 7, p. 698–706, 2017.
- BAUD, D. *et al.*–. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, Londres, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 2017.
- BELL, T. M. *et al.* Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, Viena, v. 35, n. 2, p. 183–193, 1971.
- BENNETT, K. P. *et al.* Identifying Windows of Susceptibility by Temporal Gene Analysis. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n.2740, p. 1-14, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-39318-8.pdf> . Acesso em: 30 jan. 2019
- BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles**, São Maurício, v. 19, n. 13, p. 8–11, 2014.
- BEUTNER, D. *et al.* Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.374, n. 22, p. 1–3, 2016. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1604449?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 27 dez 2018.
- BOGOCH, I. I. *et al.* Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, Londres, v. 387, n. 10016, p. 335–336, 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. **Ministério da Saúde**, Brasília, v. 49, n. 49, nov. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf> . Acesso em: 03 jan 2019

BOWEN, J. R. *et al.* Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 13, n. 2, p. 1–30, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5289613/pdf/ppat.1006164.pdf> . Acesso em: 25 jan 2019

BRITO, C. Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 28, n. 6, p. 679–680, 2016.

CAMPOS, T. D. L. *et al.* Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **International Journal of Genomics**, Nova Iorque, v. 2018, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6196792/pdf/IJG2018-6941735.pdf> . Acesso em: 22 jan 2019.

CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1985–1986, 2014.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. **The Lancet**, Londres, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome, 10 December 2015. **European Centre for Disease Prevention and Control**, Solna, n.4, p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>. Acesso em: 12 jan 2019

CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Rapid risk assessment. Zika virus disease epidemic : potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Second update, 8 February 2016 conclusions. **European Centre for Disease Prevention and Control**, n. January, p. 1–20, 2016. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/zika%20virus%20rapid%20risk%20assessment%2010-05-2016.pdf>. Acesso em: 23 jan 2019.

CHANG, L.; *et al.* Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. **Nature**, Londres, v. 522, n. 7557, p. 450–454, 2015.

CHIMAREL, A. I. *et al.* Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis.

Virus Research, Amsterdã, v. 254, p. 34-40, 2018.

CRÉANGE, A. Guillain-Barré syndrome: 100 years on. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 12, p. 770–774, 2016.

CUNGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, Londres, v.543,n. 7606, p. 267-272, 2017.

DANG, J. *et al.* Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2017.

DEVHARE, P. *et al.* Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell Death and Disease**, Londres, v.8, n.10, p. 1-8, 2017. Disponível em: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5682681/pdf/cddis2017517a.pdf>. Acesso em: 23 jan 2019.

DIAMOND, M. S. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. **Immunology and Cell Biology**, Adelaides, v. 81, n. 3, p. 196–206, 2003.

DICK, G. W. *et al.* Zika Virus (I). Isolations and Serological Specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 146–154, 1952.

DUFFY, M. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

EICKMANN, S. H. *et al.* Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, p. 1–3, 2016.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: Virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **Journal of Hygiene**, Londres, v. 83, n. 2, p. 213–219, 1979.

FAUCI, A. *et al.* Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 363, n. 1, p. 1–3, 2016.

FAYE, O. *et al.* Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. *et al.* Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009.

FLEMING, S. Viral Inhibition of the IFN-Induced JAK/STAT Signalling Pathway: Development of Live Attenuated Vaccines by Mutation of Viral-Encoded IFN-Antagonists. **Vaccines**, Basel, v. 4, n. 3, p. 23, 2016.

FONSECA, K. *et al.* Case report: First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 91, n. 5, p. 1035–1038, 2014.

GABRIEL, E. *et al.* CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. **The Embo Journal**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 803-819, 2016.

GABRIEL, E. *et al.* Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v.20, n.3, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1934590916304611?token=C02E9247C0601C82356C16CCCB8FE744C90317601D6745127297E6ABC57FD3A890ED7530A36F960666603925F0689C01>. Acesso em: 30 jan 2019.

GARCEZ, P. P. *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, Nova Iorque, v. 352, n. 6287, p. 816-818, 2017.

GARCEZ, P. P. *et al.* Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 40780, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep40780.pdf>. Acesso em: 31 jan 2019.

GOURINAT, A. C. *et al.* Detection of Zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GRANT, A. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.

GUBLER, D. J. *et al.* History and emergence of Zika virus. **The journal of infectious diseases**, Oxford, v. 216, n. 216, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5853376/pdf/jix451.pdf>. Acesso em: 20 mar 2018.

GUEDES, D. R. D. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, Nova Iorque, v. 6, n. 8, p.1-10, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583667/pdf/emi201759a.pdf>. Acesso em 07 abr 2018.

HAMEL, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v.89, n.17, p. 8880-8896, 2015.

HANNERS, N. W. *et al.* Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. **Cell Reports**, Cambridge v. 15, n. 11, p. 2315–2322, 2017.

HARLEY, M. E. *et al.* Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. **EMBO Journal**, Oxford, v. 29, n. 14, p. 2407–2420, 2010.

HASAN, S. S. *et al.* Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2018.

HASSETT, M.; WOLF, K. J.; SCHWETYE, K. E.; *et al.* CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 14, n. 9, p. 1–24, 2018. Disponível em: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6136803/pdf/ppat.1007237.pdf>. Acesso:23 fev 2019.

HASTINGS, A. K. *et al.* Zika virus and sexual transmission: A new route of transmission for mosquito-borne flaviviruses. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 90, n. 2, p. 325–330, 2017.

HEUKELBACH, *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, Basel, v. 10, n. 2, p. 116–120, 2016.

HERTZOG, J. *et al.* Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 48, p. 1120-1136, 2018.

HILLER, S. *et al.* Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses - Brazil, 2015. **Morbidity and mortality weekly report**, Atlanta, v. 94, n. 4, p. 490–514, 2015.

HUSSAIN, M. S. *et al.* A Truncating Mutation of CEP135 causes Primary Microcephaly and Disturbed Centrosomal Function. **American Journal of Human Genetics**, Blatimore, v. 90, n. 5, p. 871-878, 2012.

HUANG, W. C. *et al.* Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. **Scientific Reports**, Londres, v.6, p. 1-8, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep34793.pdf>. Acesso em: 14 fev 2019.

HUANG, H. *et al.* CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 91, n. 22, p. 1–15, 2017. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5660488/pdf/e00900-17.pdf>. Acesso em: 15 fev 2019.

HUANG, J.; BONNI, A. A decade of the anaphase-promoting complex in the nervous system. **Genes and Development**, Spring Harbor, v. 30, n. 6, p. 622-638, 2016.

IMPERATO, P. J. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. **Journal of Community Health**, Nova Iorque, v. 41, n. 3, p. 674–679, 2016.

ISAWA, D.; PINES, J.; How APC/C–Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 13, n. 3, p. 223-234, 2010.

KALAY, E. *et al.* CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome, **Natural Genetics**, Nova Iorque, v. 43, n. 1, p. 23-26, 2011.

KAPANIDOU, M. *et al.* Cdc20: At the Crossroads between Chromosome Segregation and Mitotic Exit. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 42, n. 3, p. 193-205, 2017.

KIM, A. H. *et al.* A Centrosomal Cdc20-APC Pathway Controls Dendrite Morphogenesis in Postmitotic Neurons. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 2, p. 322–336, 2009.

KONG, W.; LI, H.; ZHU, J. Zika virus: The transboundary pathogen from mosquito and updates. **Microbial Pathogenesis**, Londres, v. 114, n. 12, p. 476–482, 2018.

KUMAR, A. *et al.* Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1766–1775, 2016.

KUTSUNA, S. Two cases of Zika Fever imported from French Polynesia to Japan, December. **Eurosurveillance**, São Maurício, v. 19, n. 4, p. 1–5, 2014. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.4.20683>. Acesso em: 12 fev 2019.

KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Case report: Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 516–517, 2013.

LANCASTER, M.A.; RENNER, M.; MARTIN, C. A.; Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, Londres, v. 501, n. 7567, p. 1-21, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817409/pdf/emss-54265.pdf>. Acesso em: 24 fev 2019.

LAROCCA, R. A. *et al.* Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, Londres, v. 536, p. 7617, p.474-478, 2016.

LAZEAR, H. M. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.

LERAT, V. *et al.* Innate immunity against Zika virus. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlim, v. 28, n. 4, p. 167–174, 2017.

LESTER, S. N.; LI, K. Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity. **Journal of molecular biology**, Amsterdã, v. 426, n. 6, p. 1246–1264, 2013.

LI, C. *et al.* Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. **Cell Discovery**, Londres, v. 4, n. 43, p. 1-12, 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6066496/pdf/41421_2018_Article_42.pdf. Acesso em: 13 jan 2019

LI, H.; *et al.* The Neurobiology of Zika Virus. **Neuron Review**, Cambridge, v.92, n. 5, p. 949-958, 2016.

LI, H. *et al.* Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell Stem Cell**, Londres, v. 8, n. 10, p. 593-598, 2016.

LI, H. *et al.* Zika Virus Protease Cleavage of Host Protein Septin-2 Mediates Mitotic Defects in Neural Progenitors. **Neuron.**, Cambridge, v. 101, n. 6, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6690588/pdf/nihms-1040697.pdf>. Acesso em: 08 fev 2019.

LIANG, Q. *et al.* 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**, Cambridge, v. 20, n. 5, p. 1-10, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5144538/pdf/nihms833692.pdf>. Acesso em: 09 mar 2019.

LIN, S. *et al.* Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. **Virology**, Nova Iorque, v. 15, n. 527, p. 580-587. 2019

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, Nova Iorque, v. 59, p. 23–61, 2003.

LIU, J. *et al.* Zika Virus Envelope Protein induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via an Intrinsic Cell Death Signaling Pathway in Neuroendocrine PC12 Cells. **International Journal of Biological Sciences**. Lake Haven, v.14, n.9, p. 1099-1108, 2018.

LOWE, R. *et al.* The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 15, n. 1, p. 96, 2018.

LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 785–788, 2015.

MARANO, G. *et al.* Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. **Blood Transfusion**, Milão, v. 14, n. 2, p. 95–100, 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v49n1/0037-8682-rsbmt1015900037868202202015.pdf>. Acesso em: 08 fev 2019.

MARTHIENS, V. *et al.* Centrosome amplification causes microcephaly. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 15, n. 7, p. 731–740, 2013.

MEDIN, C. L.; ROTHMAN, A. L. Zika Virus The Agent and Its Biology, With Relevance to Pathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago,

v. 141, n.1, 2017. Disponível em:

<https://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.5858/arpa.2016-0409-RA>. Acesso em: 25 jan 2018.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S.; Understanding how Zika Virus Enters and Infects Neural Target Cells. **Cell Stem Cell**, Crambridge, v.18, n. 8, p.1-2, 2016. Disponível em:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1934590916300522?token=1ABE9763F5B7231132C1EC66EB069971D850ADAD66C79A991166660D2C4745AEAA51A1A5D5DA17B149D4D67F3EDE8A5C>. Acesso em: 15 jan 2018.

MINER, J. J. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, Cambridge, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2017.

MIRANDA, H. A. *et al.* Expanded Spectrum of Congenital Ocular Findings in Microcephaly with Presumed Zika Infection. **Ophthalmology**, Rochester, v. 123, n. 8, p. 1788–1794, 2016.

MIRANDA-FILHO, D. B. *et al.* Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 106, n. 4, p. 598–600, 2016

MITTAL, R. *et al.* Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 486, p. 23-30, 2017.

MO, M. *et al.* How viruses affect the cell cycle through manipulation of the APC/C. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, n. 9, p. 440–448, 2012.

MOREIRA, J. *et al.* Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 23, n. 5, p. 296–305, 2017.

MUSACCHIO, A.; SALMON, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 8, n. 5, p. 379–393, 2007.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

MUSSO, D. *et al.* Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.

MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v. 68, n.53, p. 53–55, 2015.

MUSSO, D. *et al.* Potencial sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

- NGONO, A. E. *et al.* Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host Microbe**, Crambridge, v. 21, n. 1, p. 35–46, 2018.
- NICASTRI, E. *et al.* Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, São Maurício, v. 21, n. 32, p. 1–4, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4998502/pdf/eurosurv-21-30314.pdf>. Acesso em: 28 jan 2019.
- NORONHA, L. *et al.* Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 5, p. 287–293, 2016.
- OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, São Maurício v. 1, n. 12, p. 7–9, 2014.
- OLSON, J. *et al.* Zika Virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 389-393, 1981.
- ONORATI, M. *et al.* Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. **Cell Reports**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 2576–2593, 2016.
- PINES, J. Cubism and the cell cycle: The many faces of the APC/C. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 12, n. 7, p. 427–438, 2011.
- PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.
- PRASAD, V. M. *et al.* Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nature Structural and Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 24, n. 2, p. 184–186, 2017.
- RAMOS DA SILVA, S.; CHENG, F.; GAO, S.-J. ZIKV-Host Interactions. **Viruses**, Basel, v.10, n. 5, p. 233- 257, 2018.
- RASMUSSEN, S. A. *et al.* Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016.
- ROSA-FERNANDES, L. *et al.* Zika Virus Impairs Neurogenesis and Synaptogenesis Pathways in Human Neural Stem Cells and Neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, v. 13, n. 64, p. 1-16, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6436085/pdf/fncel-13-00064.pdf>. Acesso: 25 fev 2019.
- RASTOGI, M. *et al.* Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, Londres, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4966872/pdf/12985_2016_Article_590.pdf. Acesso em: 13 fev 2018.

ROBBINS, J. A.; CROSS, F.; Regulated degradation of the APC coactivator Cdc20. **Cell Division**, Londres, v.5, n.23, p.1-9, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949745/pdf/1747-1028-5-23.pdf>. Acesso em: 19 abr 2018.

ROBY, J. A. *et al.* Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **Journal of General Virology**, Londres, v. 96, n. 7, p. 1551–1569, 2015. Disponível em: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/96/7/1551_vir000097.pdf?expires=1573241051&id=id&accname=sgid026594&checksum=B841614A9858EB1617D5620DFEEA5168. Acesso em: 17 jan 2019

ROLFE, A. J. *et al.* Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. **Cell and Bioscience**, Londres, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4902960/pdf/13578_2016_Article_110.pdf. Acesso em: 14 jan 2019.

ROTHAN, H.A. *et al.* Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. **Molecular neurobiology**, Clifton, v. 56, n. 4, p. 2551-2557, 2018.

SAIZ, J. C. *et al.* Zika virus: The latest newcomer. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 496, p. 1–19, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835484/pdf/fmicb-07-00496.pdf>. Acesso em: 25 jan 2019.

SHARMA, A.; LAL, S. K. Zika virus: Transmission, detection, control, and prevention. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 110, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5290000/pdf/fmicb-08-00110.pdf>. Acesso em: 24 fev 2019.

SHIPLEY, M. M. *et al.* Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, v.108, n. 53193, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828168/pdf/jove-108-53193.pdf>. Acesso em: 14 mar 2019.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 339–348, 1964.

SIROHI, D. *et al.* The 3.8Å resolution cryo-EM structure of Zika Virus. **Science**, Nova Iorque, v. 352, n. 6, p. 467–470, 2016.

SLOMNICKI, L. P. *et al.* Ribosomal stress and Tp53- mediated neuronal apoptosis in response to capsid protein of the Zika virus. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, p. 1-15, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/29192272/>. Acesso em: 23 mar 2019.

SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 69, n. 2, p. 223–234, 1952.

SONG, B. H. *et al.* Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdã, v. 308, p. 50–64, 2017.

SONG, H. *et al.* Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature Structural and Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 23, n. 5, p. 456–458, 2016.

SOUZA, B. S. F. *et al.* Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, Londres, v. 6, n. 1, p. 39775–39788, 2016.

SOUZA, W. V. *et al.* Microcephaly in Pernambuco State, Brazil: epidemiological characteristics and evaluation of the diagnostic accuracy of cutoff points for reporting suspected cases. **Cadernos de saude publica**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. e00017216, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/csp/v32n4/en_1678-4464-csp-32-04-e00017216.pdf. Acesso em: 10 fev 2019.

SUMMERS, D. J. *et al.* Zika Virus in an American Recreational Traveler. **Journal of Travel Medicine**, Hamilton, v. 22, n. 5, p. 338–340, 2015.

SUTHAR, M. S. *et al.* Innate Immune Sensing of Flaviviruses. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 9, n. 9, p. 5–8, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771895/pdf/ppat.1003541.pdf>. Acesso em: 25 fev 2019.

TANG, H. *et al.* Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: Detection, control, etiology, and future scenarios. **American Journal of Public Health**, Nova Iorque, v. 106, n. 4, p. 601–605, 2016.

THORNTON, G. K.; WOODS, C. G. Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? **Trends in Genetics**, Amsterdã, v. 25, n. 11, p. 501–510, 2009.

VENTURA, C. V. *et al.* Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, Londres, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016.

VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: What we know and what we should investigate urgently. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 48, p. 85–90, 2016.

WAN, L. *et al.* APCCdc20 suppresses apoptosis through targeting Bim for ubiquitination and destruction. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 29, n. 4, p. 377–391, 2014.

- WANG, W. *et al.* Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nature Communications**, Londres, v. 9, n. 1, p. 106, 2018.
- WAY, H. J. *et al.* Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice. **Journal of General Virology**, Londres, v. 30, n. 1, p. 123–130, 1976.
- WEISBLUM, Y. *et al.* Zika Virus Infects Early- and Midgestation Human Maternal Decidual Tissues, Inducing Distinct Innate Tissue Responses in the Maternal-Fetal Interface. **Journal of Virology**, Nova Iorque, v. 91, n. 4, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/91/4/e01905-16>. Acesso em: 23 jan 2018.
- WU, Y. *et al.* Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, Londres, v. 3, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359216/pdf/celldisc20176.pdf>. Acesso em: 24 fev 2019.
- YAKOB, L.; WALKER, T. Zika virus outbreak in the Americas: The need for novel mosquito control methods. **The Lancet Global Health**, Londres, v. 4, n. 3, p. e148–e149, 2016. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2214109X16000486?token=DD74C2A0D54370FE22E45625A38EA7ABECB7807C18E175DB060D33FBA04671B0E2F69BBD DCD9631AE973BEC381D6D177>. Acesso em: 10 fev 2018.
- YUN, S.; LEE, Y.-M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.
- ZAKERI, Z. *et al.* Viral Manipulation of Cell Death. **Current Pharmaceutical Design**, Sharaj, v. 14, n. 3, p. 198–220, 2008.
- ZAMMARCHI, L. *et al.* Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v. 63, p. 32–35, 2015.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.
- ZANLUCA, C.; *et al.* Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, Paris, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.
- ZHAO, B. *et al.* Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communication**, Londres, v. 8, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms14762.pdf>. Acesso em: 17 fev 2019.
- ZHANG, N. *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.
- ZHANG, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**,

Oxford, v. 22, n. 11, p. 2601-2613, 2003.

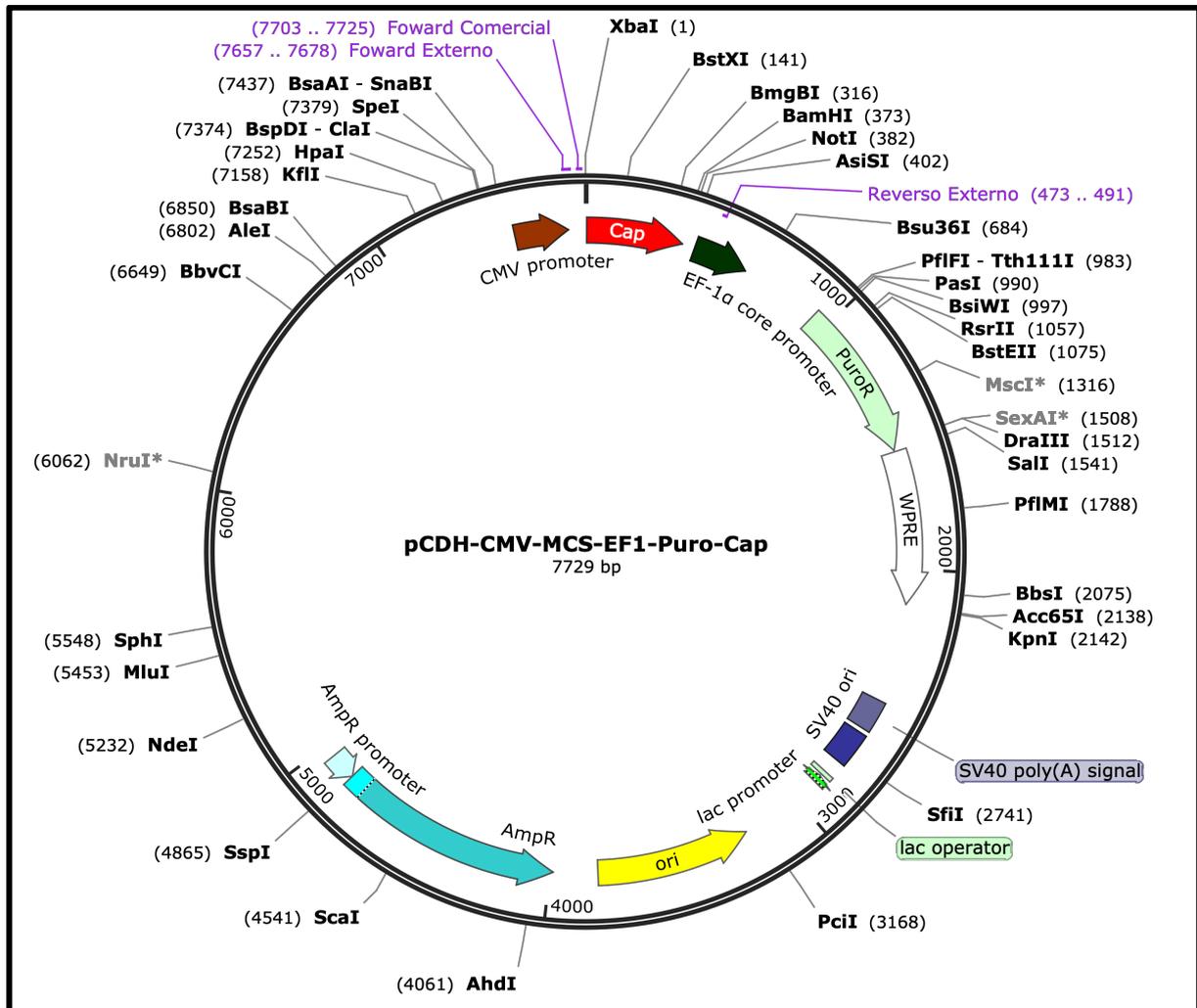
ZHANG, Y. *et al.* Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. **Structure**, Londres, v. 12, n. 9, p. 1607–1618, 2004.

ZHENG, X. *et al.* Conserved TCP domain of Sas-4/CPAP is essential for pericentriolar material tethering during centrosome biogenesis. **Cell Biology**, Londres, v. 11, n. 3, p. 354-363, 2014

ZHOU, Z.; HE, M.; SHAH, A. A.; WAN, Y. Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. **Cell Division**, Londres, v. 11, n. 9, 2016.

APÊNDICE A- MAPA DO VETOR PCDH-CAP

Figura 01- Mapa do vetor pCDH-Cap

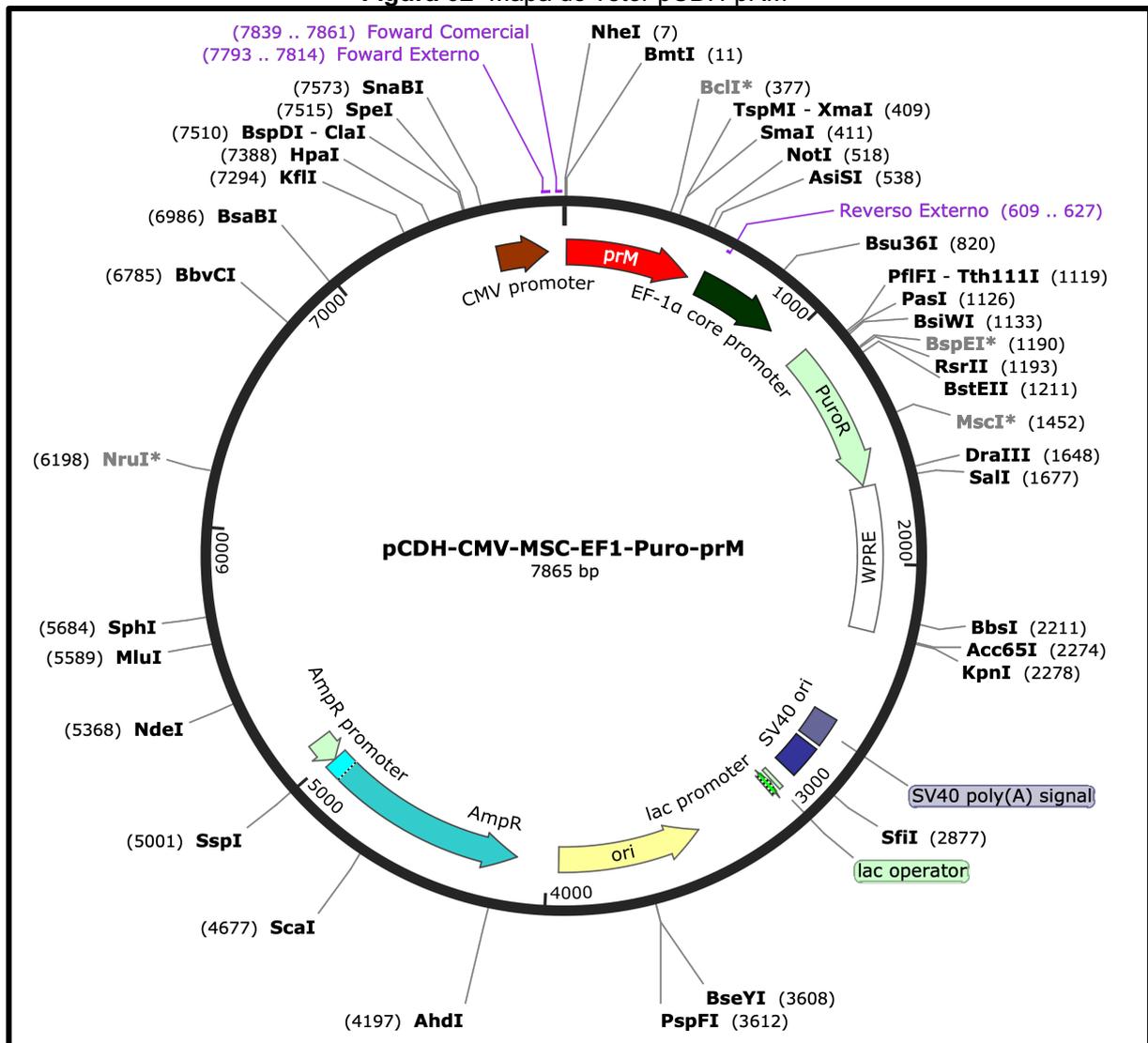


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE B- MAPA DO VETOR PCDH-PRM

Figura 02- Mapa do vetor pCDH-pRM

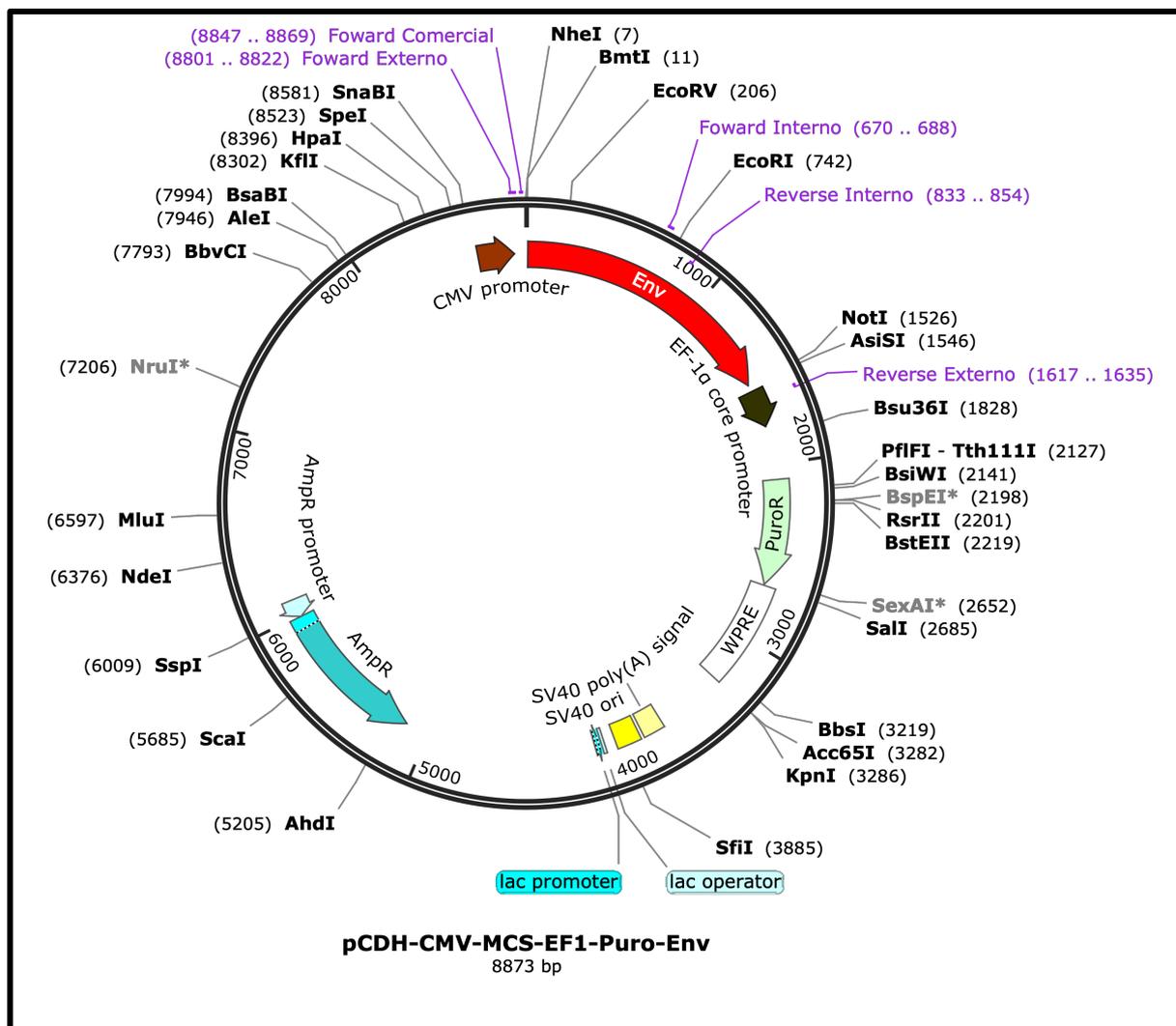


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE C- MAPA DO VETOR PCDH-E

Figura 03- Mapa do vetor pCDH-E

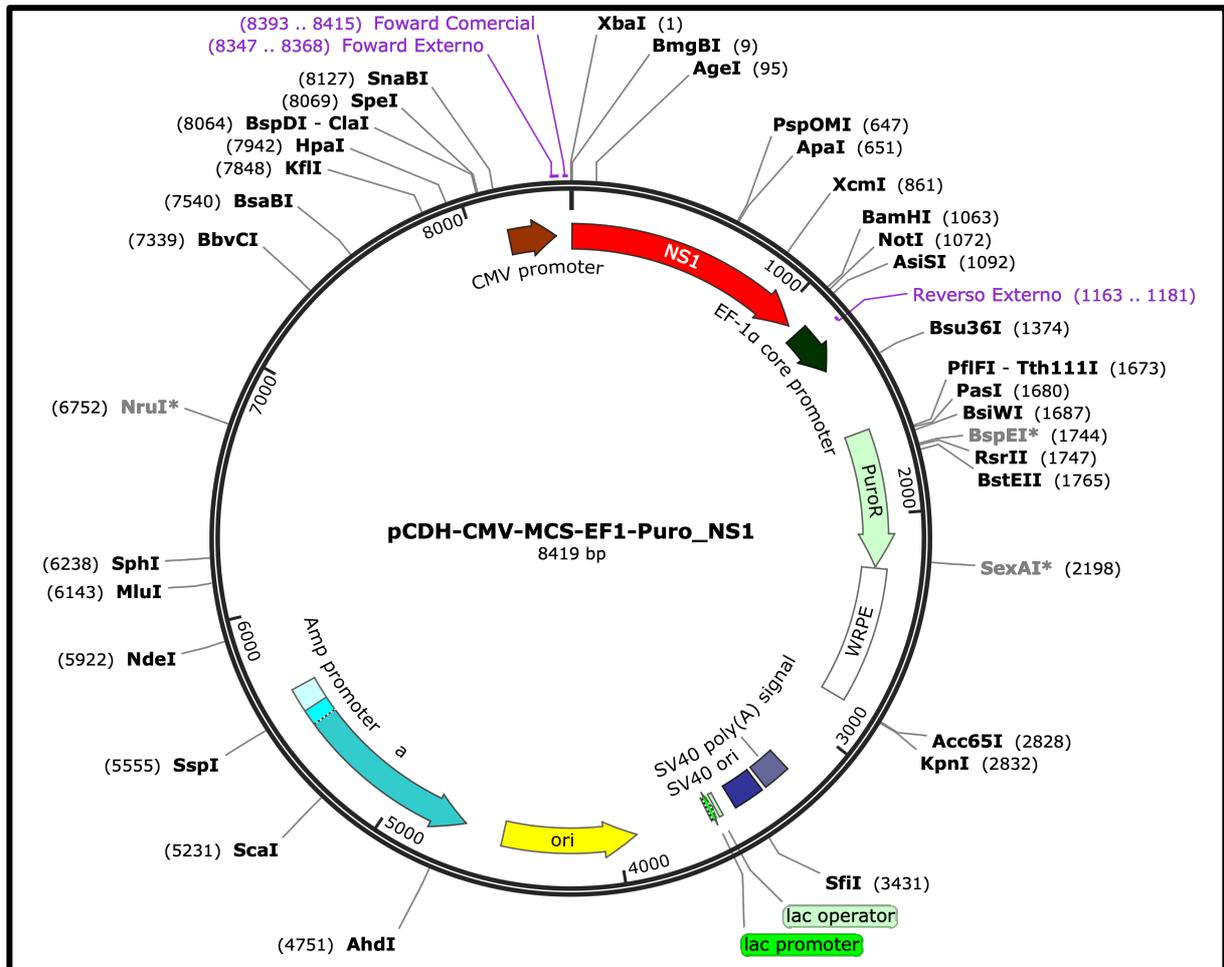


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE D- MAPA DO VETOR PCDH-NS1

Figura 04- Mapa do vetor pCDH-NS1

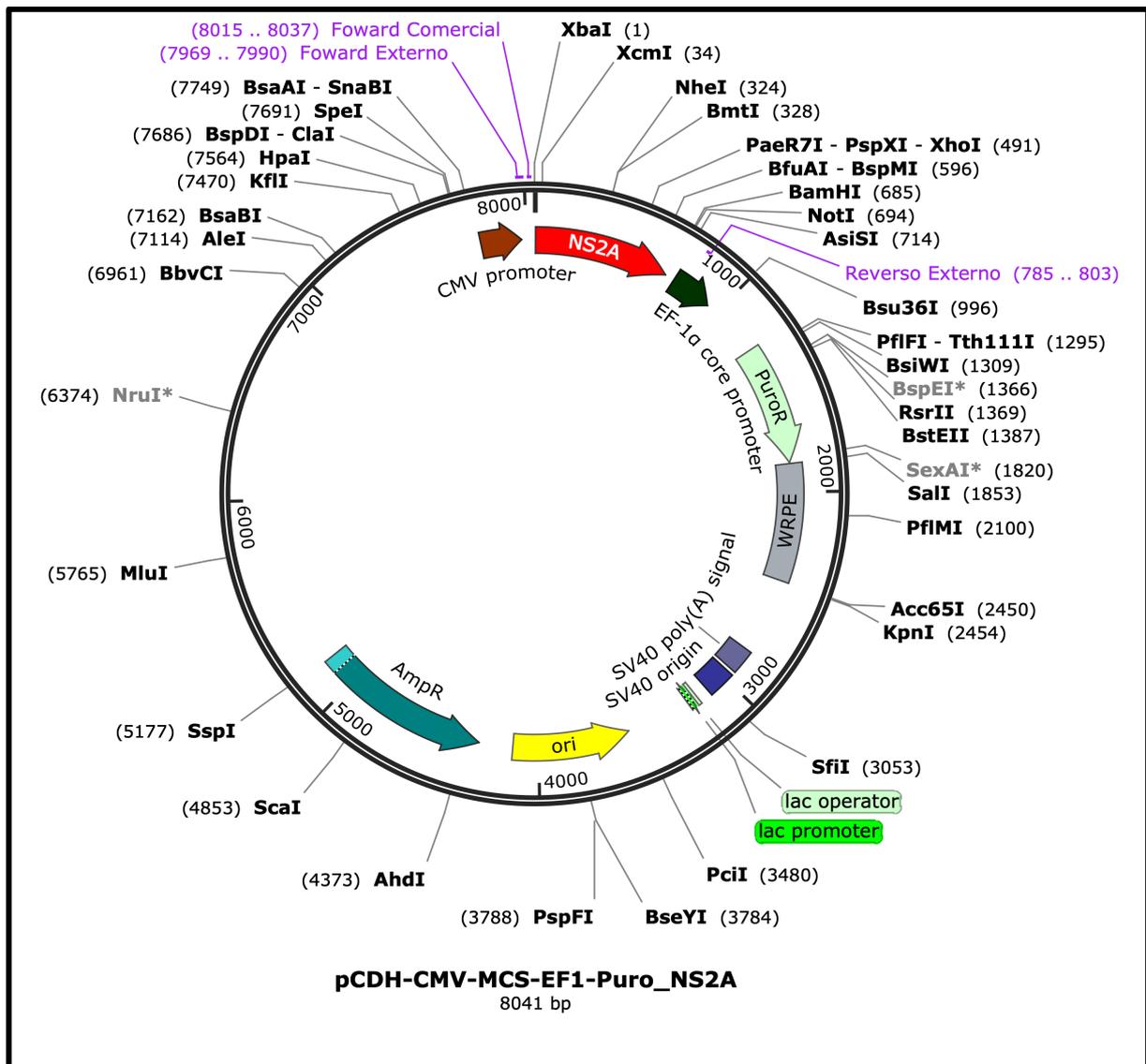


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE E- MAPA DO VETOR PCDH-NS2A

Figura 05- Mapa do vetor pCDH-NS2A

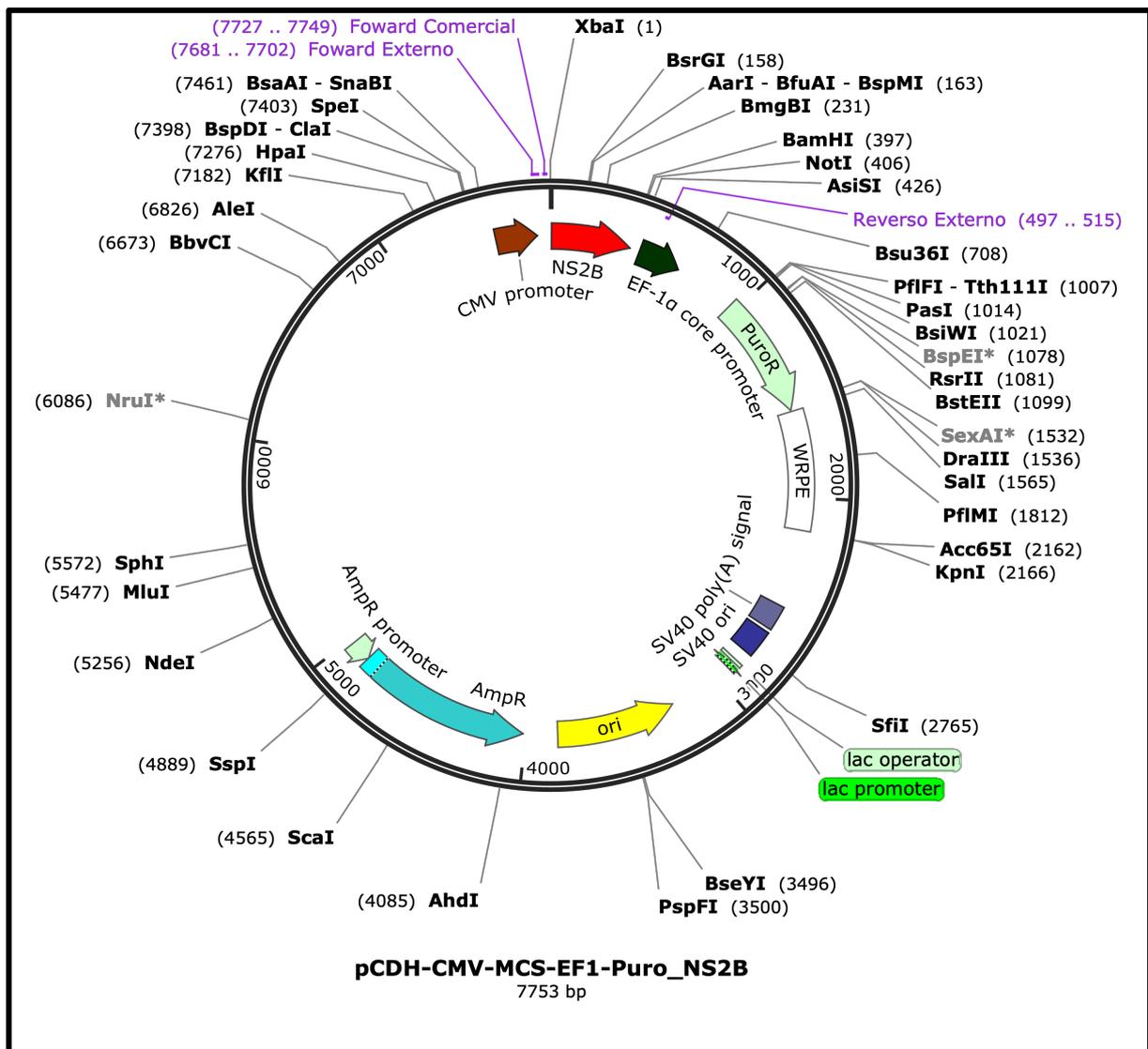


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o software SnapGene.

APÊNDICE F- MAPA DO VETOR PCDH-NS2B

Figura 06- Mapa do vetor pCDH-NS2B

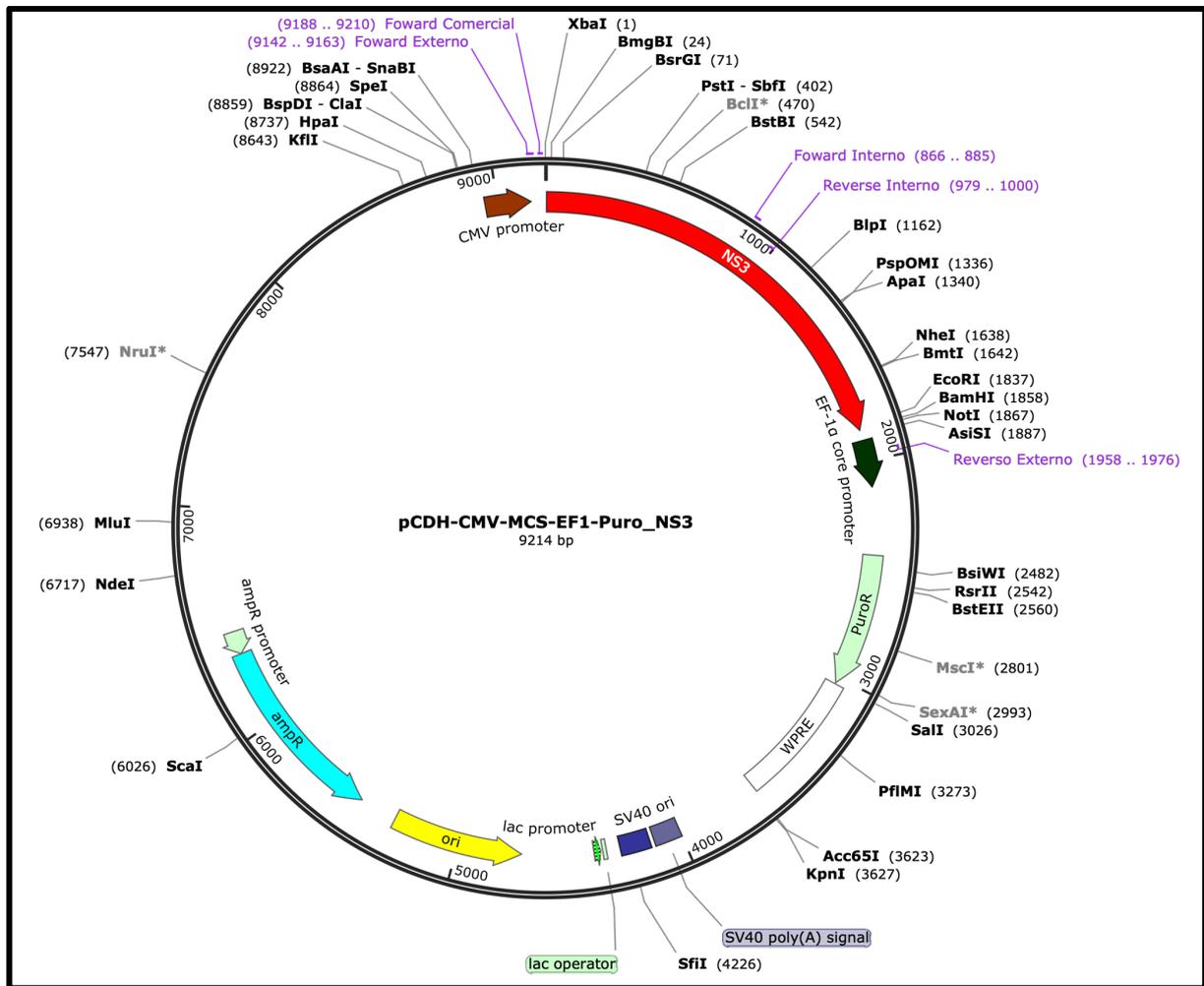


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE G- MAPA DO VETOR PCDH-NS3

Figura 07- Mapa do vetor pCDH-NS3

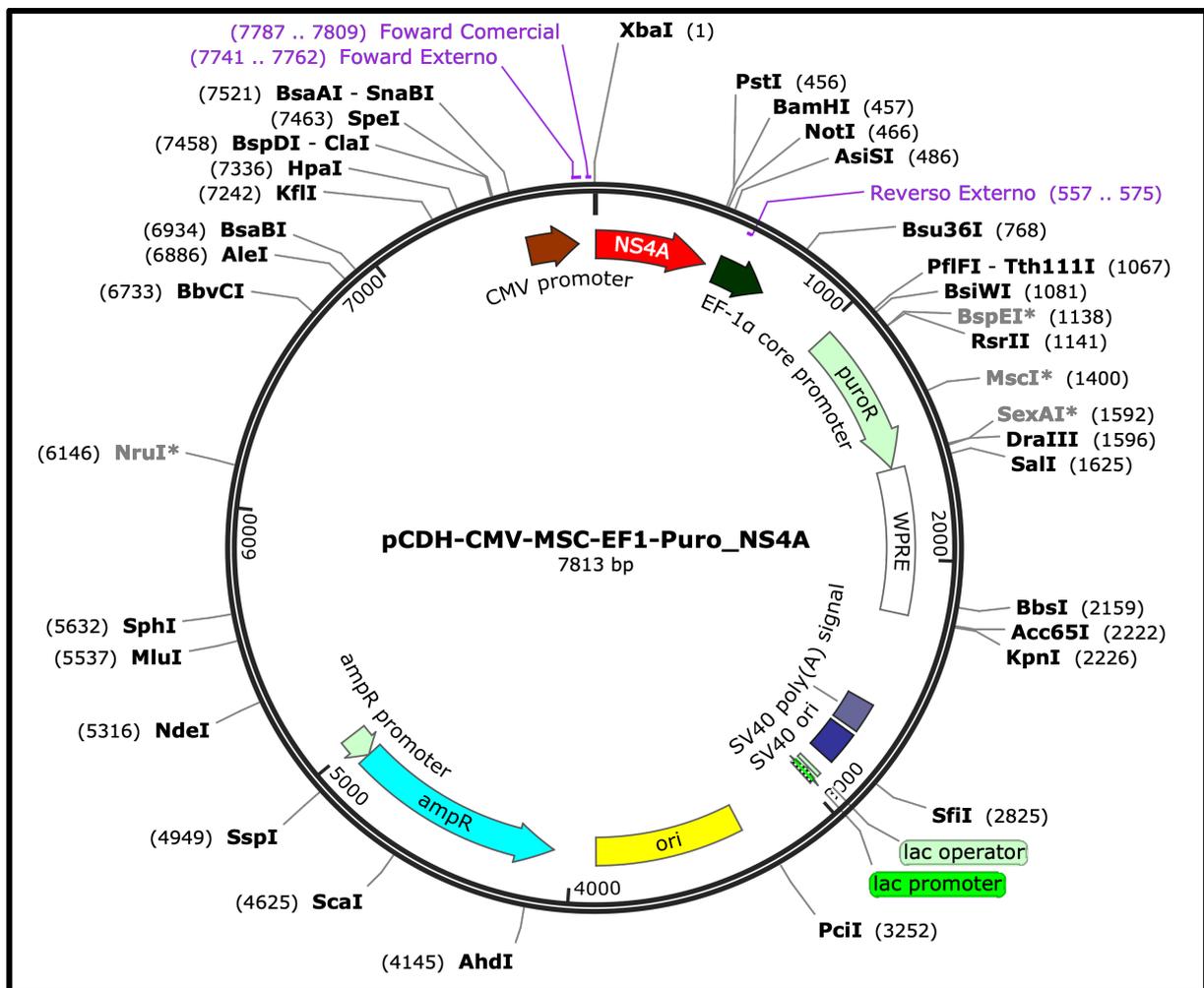


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE H- MAPA DO VETOR PCDH-NS4A

Figura 28- Mapa do vetor pCDH-NS4A

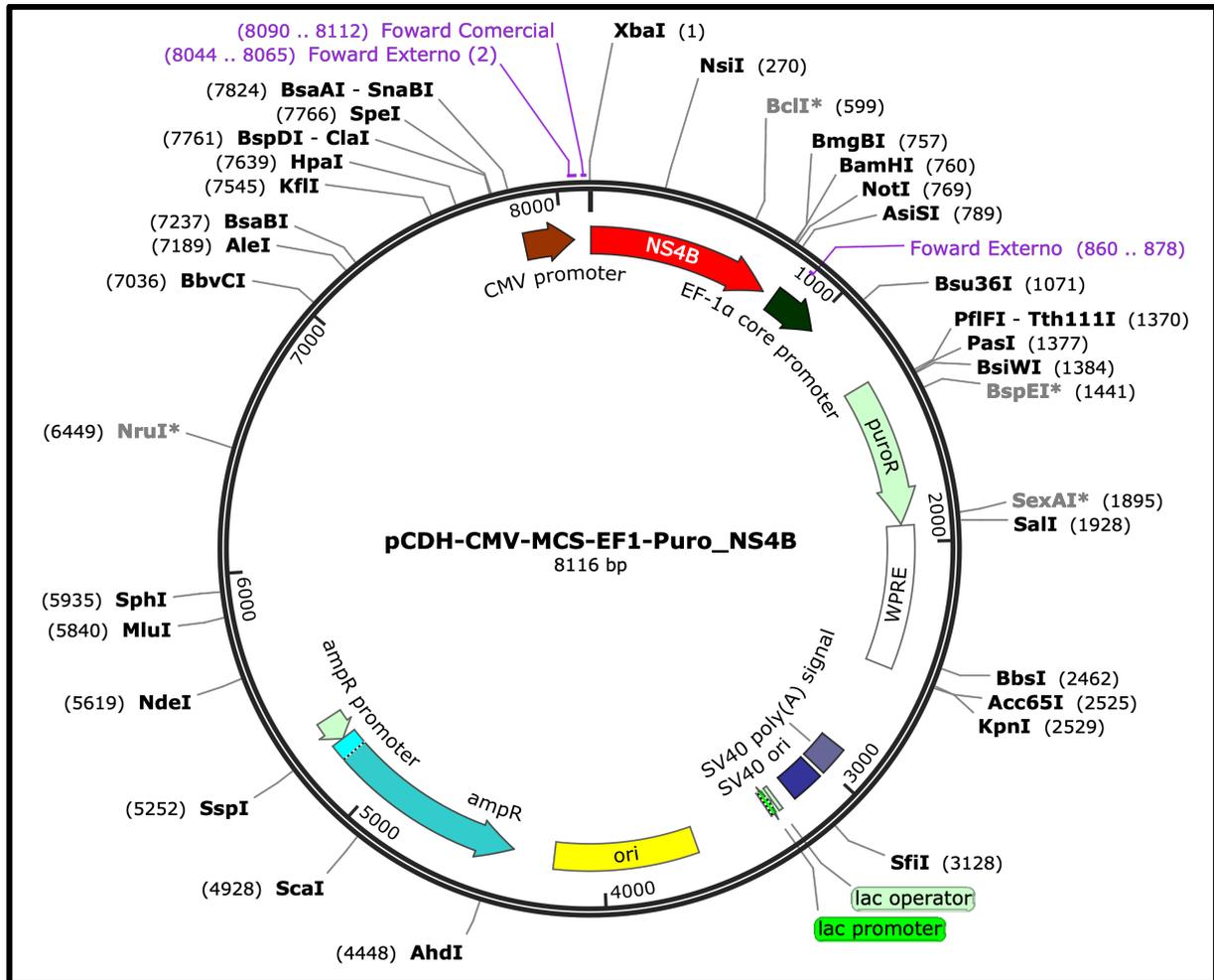


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE I- MAPA DO VETOR PCDH-NS4B

Figura 08- Mapa do vetor pCDH-NS4B

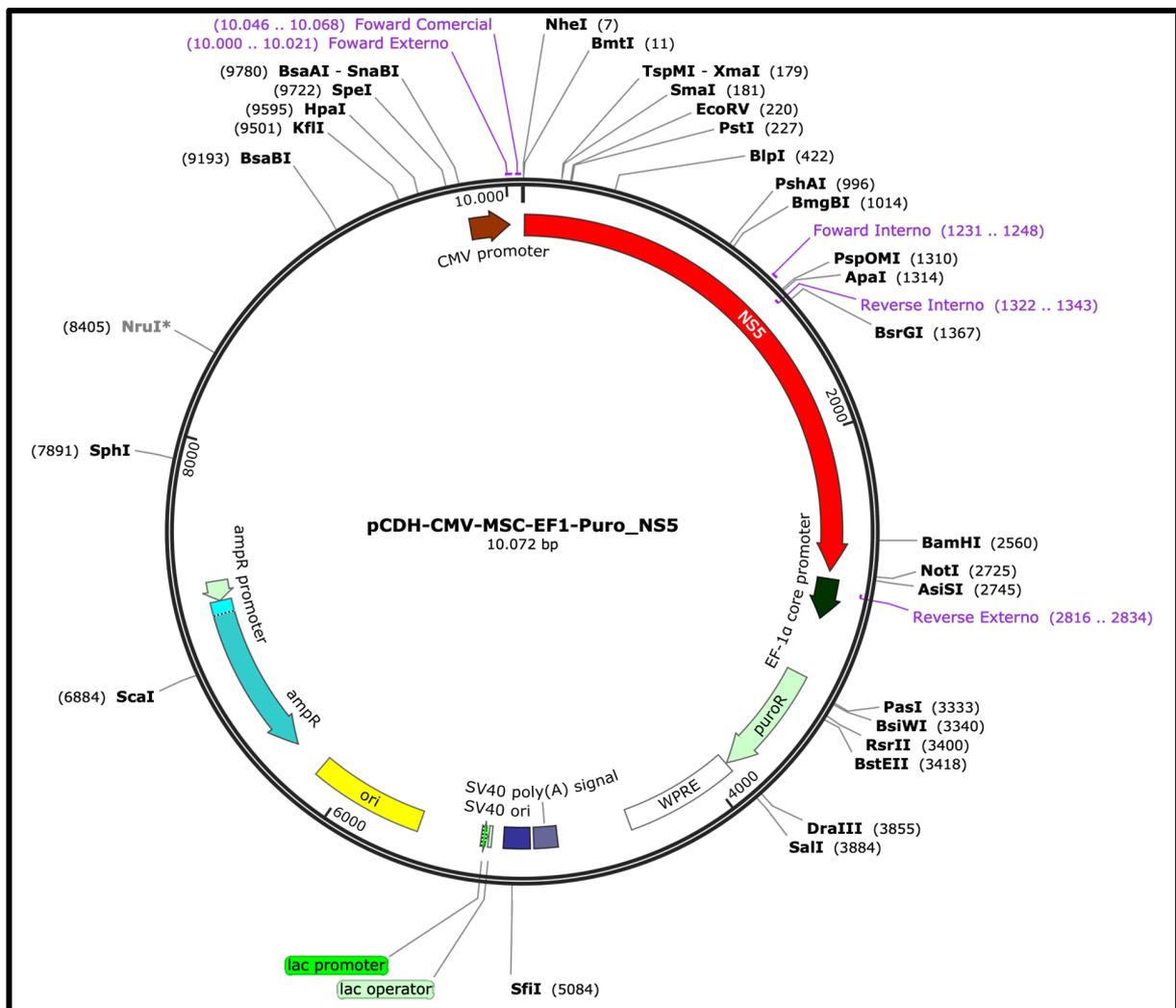


Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o software SnapGene.

APÊNDICE J- MAPA DO VETOR PCDH-NS5

Figura 10- Mapa do vetor pCDH-NS5



Fonte: O Autor, 2019

Nota: a construção do mapa foi feita usando o *software* SnapGene.

APÊNDICE J- MANUSCRITO DO ARTIGO

E and prM ZIKV protein mediate the downregulation of Cdc20 in infected or transfected SH-SY5Y cells.

Renan Willian Alves¹, Antonio Fernando da Purificação Júnior¹, Elidianne Aníbal da Silva², Elisa Almeida Neves de Azevedo¹, Morganna Costa Lima¹, Pedro Luiz França Neto³, Rafael Freitas de Oliveira França¹

1. Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil
2. Laboratory of Inflammation and Pain, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil
3. Genetics Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Corresponding Author: Rafael França, PE, Laboratory of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil. Phone: (+55) (81)2101-2668; e-mail: rafael.franca@cpqam.fiocruz.br;

Abstract

The zika virus has become a global public health problem because of its high capacity for dissemination and infection in humans and because it is associated with the increase in the incidence of neurological disorders such as Zika Congenital Syndrome and Guillain-Barré Syndrome. The virus is capable to infect and destroy several cell types, but shows high tropism by neuronal cells inducing the death and inhibiting the proliferation and differentiation of this cell line. Viruses, generally, use the cellular machinery in the replication process to give continuity to the viral cycle and as a consequence of it causes changes in the functioning of host cells. Given this background, analyzing the interactions of the viral proteins with the proteins of the host cells allows to understand the mechanisms of the pathogenesis of the viral infection and as there is currently no specific anti-ZIKV treatment, studies of this type can provide essential information in the search for possible therapeutic targets for new antiviral drugs. In this project, we will analyze the interaction of the structural and non-

structural proteins of ZIKV, individually, with the expression of the Cdc20 protein, which is involved in the activation/inactivation of APC, a multifunctional protein complex related to the regulation of various physiological processes in the cell, but mainly, it participates in the regulation of the cycle of cell division, guaranteeing the progression of mitosis and the correct separation of the sister chromatids.

Introduction

The Zika virus (ZIKV), a member of the *Flaviviridae* family^(1,2) is a virus transmitted mainly by mosquitos of the *Aedes* spp. Although ZIKV causes infection typically asymptomatic and sometimes mild illness, it was associated with maternal infection and viral transmission to the fetus during the 2015 outbreak in Brazil⁽³⁻⁵⁾ The result of the congenital infection is the appearance of neurological disorders Zika Congenital Syndrome including microcephaly⁽⁶⁻⁹⁾.

The ZIKV is an enveloped virus with icosahedral capsid, single-stranded and positive-sense genic RNA that encodes all virus proteins⁽¹⁰⁾. The replication of its genetic material occurs in the cytoplasm of the host cells and during the translation process a single polyprotein molecule is synthesized, which will subsequently be cleaved by viral and host proteases into the viral proteins⁽¹¹⁾. ZIKV contains ten proteins, three structural proteins: capsid (C), membrane precursor protein (prM), envelope (E) and seven non-structural proteins NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5⁽¹²⁾. The virus is able to infect and replicate in a wide variety of cell types such as fibroblasts, keratinocytes, immature dendritic cells and neuronal cells inducing cell death, although evidence shows that ZIKV is tropism by neuronal progenitor cells compromising brain development⁽¹³⁻¹⁷⁾. The ZIKV have a small complement of only 10 proteins that can modulate cell processes to promote the viral replication and this is often mediated by interaction between viral and host cell proteins.

In this context, it is essential to understand the molecular mechanisms of ZIKV pathogenesis, seeking possible blocking pathways. ZIKV as well as other viruses, during its replication cycle, infects cells and uses host machinery to generate new infectious viral particles. Several studies indicate that the non-structural proteins of ZIKV are, directly or indirectly, involved in the pathogenesis of viral infection^(13,18-21). Primary microcephaly and impairment of neuronal development are major consequences of the depleting action of progenitor neural cells originating from

centrosome defects, premature differentiation and / or cell death ^(21,22). Addressing these issues in the context of the development of the nervous system is important to understand the mechanisms of tropism and neuropathogenesis of ZIKV. Previous studies have shown that the infection can alter cellular functions including mitosis ^(21,23,24), with infected cells demonstrating spindle misorientation and increased centrosomes numbers ⁽²⁵⁾.

In this study, we investigated the regulation of Cdc20 protein in infected SH-SY5Y cells used by ZIKV to disturb the cell cycle and cell death in order to establish productive infection. We observed that ZIKV-infected cells present decrease in the expression of Cdc20 over the, particularly after 48 hours post-infection.

Material and Methods

Cell, Virus and Plasmids

Human neuroblastoma cells SH-SY5Y (ATCC; CLR-2266) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), were cultured in 1:1 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) and Ham's F12 Mixture supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin (PEN/STREP), 1% Sodium pyruvate (SigmaAldrich) and 1% non-essential aminoacids (NEM) (SigmaAldrich). Cells were maintained in a logarithmic phase of growth in 75mL plastic culture flasks and maintain in 5% CO₂ at 37°C.

ZIKV strain PE243/2015 was originally isolated in 2015 from the serum of a patient with an acute maculopapular rash in Pernambuco State, Brazil. Viral stocks were produced in Vero cells and stored at -80°C until use, the viral titer of the stock was calculated via plaque assay on Vero cells and reached 10⁶ plaque forming units per milliliter (PFU/mL).

The expression vectors pCDH-puro with the ZIKV genes containing the Cytomegalovirus (CMV) were kindly provided by Dr. Jae U. Jung ⁽¹⁹⁾ (Department of Molecular Microbiology and Immunology). The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells. Selected clones were screened by colony PCR, restriction endonuclease digestion and confirmed by capillary electrophoresis DNA sequencing (Applied Biosystem 3500xL Genetic Analyzer).

Virus infection

SH-SY5Y cells were plated 24-well plate at a concentration of 2×10^5 per well and mock-infected with only MEM/F12 medium or infected with ZIKV at a multiplicity of infection (MOI) of 1, for two hours, after which medium was supplemented to 10% FBS final concentration and cells grown under standard conditions for 3 and 4 days.

Standardization of SH-SY5Y cells with pMEG vectors

Prior to initiating SH-SY5Y transfections with the plasmids containing the ZIKV genes, it was necessary to standardize the transfection using plasmid pMEG-GFP which has the green fluorescent protein (GFP) coding region (green fluorescence protein). About 24 hours prior to transfection, SH-SY5Y cells were plated in 24-well culture plates (2×10^5 cells / well) in MEM / F12 medium supplemented with 10% FBS, in the final volume of $500 \mu\text{L}$, these cells were left adhering to the plate for 24h and the next day transfection was performed. Lipofectamine 3000™ transfection agent was used for lipofection of the cells. The standard assay was performed using 0.5, 1 and 2 μg pMEG-GFP plasmid DNA and the lipofectamine volume in 2 and $3 \mu\text{L}$ and the cells were observed a 24 and 48h post-transfection. Lipofection of SH-SY5Y cells was initially used with the lipofectamine 3000 transfection agent, in this case, by complexes containing different amounts of plasmid pMEG (0.5, 1 and $2 \mu\text{g}$) and the transfection agent at volumes 2 and $3 \mu\text{L}$.

pCDH transfection into SH-SY5Y

The expression plasmids encoding ZIKV E, prM, Cap, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5 were transfected into the SH-SY5Y cells via liposome transfection method. Briefly, one day pre-transfection, SH-SY5Y were seeded into culture 24-well plates under standard conditions. After 24h of cultivation, a total of $1 \mu\text{g}$ of each plasmids was incubated with $2 \mu\text{L}$ lipofectamine 3000 (Thermo Scientific Fischer) and $2 \mu\text{l}$ DNA Reagent (Thermo Scientific Fischer) at room temperature for 30min to allow the DNA-liposome complexes to form before adding to the cells, which were incubated for three hours. Then the medium was supplemented to, final volume

500 μ L, at 10% FBS final concentration and cells grown under standard conditions for 1 and 2 days.

Protein extraction and quantitation

At 2 days post-transfections or post-infection, cells were collected and washed twice with PBS. Cell pellets from the transfections and infection were resuspended in RIPA buffer and chilled on ice for 30 min before centrifugation. Cell debris was removed by centrifugation at 14.000 rpm, 4°C for 30 min, and the supernatant fraction was collected for protein assays. Protein concentrations were determined using the Bradford assay.

Western blot analysis

A total of 40 μ g proteins were separated by electrophoresis through 12% SDS-polyacrylamide gels and proteins were then transferred to nitrocellulose membranes using semi-dry blot apparatus (Bio-rad). The blot membranes were blocked with 7,5% skim milk in PBS containing 0,1% Tween 20 (PBS-T) with gentle shaking at room temperature for 6h. Proteins were detected by incubating membranes with a 1:1000 dilution of a rabbit polyclonal anti-Cdc20 antibody (Abcam) and a 1:6000 dilution of a rabbit monoclonal anti-GAPDH antibody as primary antibodies with gentle shaking at 4°C for overnight. The membrane was then incubated with 1:30000 dilution of a horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit (Abcam) as appropriate, as secondary antibodies with gentle shaking at room temperature for 1h. The immunoreactive signal on the membrane was developed using Lumina Forte Western HRP substrate and signal was detected by chemiluminescence using ImageQuant LAS 500.

Cell proliferation assay

For detection of cell proliferation, plasmids transfected cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and fixed with 70% ice cold ethanol at 4°C for overnight, followed by treatment with anti-Ki-67 (SigmaAldrich, US) solution at a final

concentration of 50 µg/ml. The DNA content was measured using flow cytometry (Beckman Coulter, Epics XL).

Cell cycle analyses

For detection of cell cycle, plasmids transfected cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and fixed with 70% ice cold ethanol at 4°C for overnight, followed by treatment with PI (SigmaAldrich, US) solution at a final concentration of 50 µg/ml. The DNA content was measured using flow cytometry (Beckman Coulter, Epics XL).

Immunofluorescence analyses

The immunostaining method was used to determine ZIKV gens transfection. Briefly, SH-SY5Y cells were infected with ZIKV or transfected with the plasmids described above. ZIKV-infected and transfected cells were fixed at 48h post-infection/transfection 4% paraformaldehyde (Solarbio,China) for 20 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Biosharp, China) for 15 min. Immunostaining was then done on the fixed cells as using a monoclonal antibody against E, prM, Cap, NS1, NS2B, NS3, NS4B and NS5 proteins at 1: 500 dilution (GeneTex, US) followed by Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG 1:1,000 (ThermoFisher Scientific, US) as the secondary antibody. Nuclei DNA staining was performed with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, US). Images were captured using a fluorescence microscope (Nikon, Japan).

Statistical Analysis

Two-way ANOVA analysis was used to analyze results generated for the proliferation assays, respectively using Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A difference is considered statistically significant if $p \leq 0.1$ (*) and $p \leq 0.05$ (**) according to conventional definitions.

Results

Confirmation of the vector pCDH-puro containing the ZIKV genes

The identity of the genes inserted in the constructions were confirmed by restrictions enzyme cleavage. The vectors containing the Cap, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4B, NS5 genes were cleaved with *BamHI/XbaI* and the E, prM and NS5 genes were cleaved with *NotI/NheI* (Supplementary Figure 1 and Figure 2) and partial sequencing (Supplementary Figure 3 and Figure 4).

SH-SY5Y transfection with the pMEG-GFP vector

Since SH cells are extremely sensitive to disturbance to their culture environment and for the initial standardization of the experiments different concentrations of DNA and the transfection agent were tested to continue the study. For these experiments, transfection in SH-SY5Y was optimized by employing a plasmid vector (pMEG) containing the gene encoding the GFP protein.

To verify the possible morphological changes resulting from the transfection with lipofectamina the appearance of the cells in culture, observed under light microscope, was evaluated. In general, when the cells were observed under a microscope, they presented a homogeneous carpet with few cells in the supernatant and no change in their morphology (data no shown), indicating that lipofectamine in the 2 and 3uL volumes did not present cytotoxicity.

The proportion of fluorescent cells was evaluated after 24 and 48 hours, under fluorescence microscopy and by flow cytometry. Fluorescence was detected in all transfected groups (data not shown), the best results being obtained using 1 μ g of pMEG plasmid in 2 μ l of lipofectamine after 48 hours post-transfection (Figure 1). After 24 and 48 hours post-transfection the results obtained showed that the transfection with this plasmid vector was functional, since efficient expression of the GFP protein in all the groups, observing that in some conditions, about 60% of the cells were transfected (Figure 1). In the group after 24h of transfection the percentage of transfected cells ranged from 8-42% (Supplementary Figure 5) and in the 48h post-transfection group the expression of GFP in the positive cells ranged from 2-60%. It was also observed that there was no significant variation in the groups.

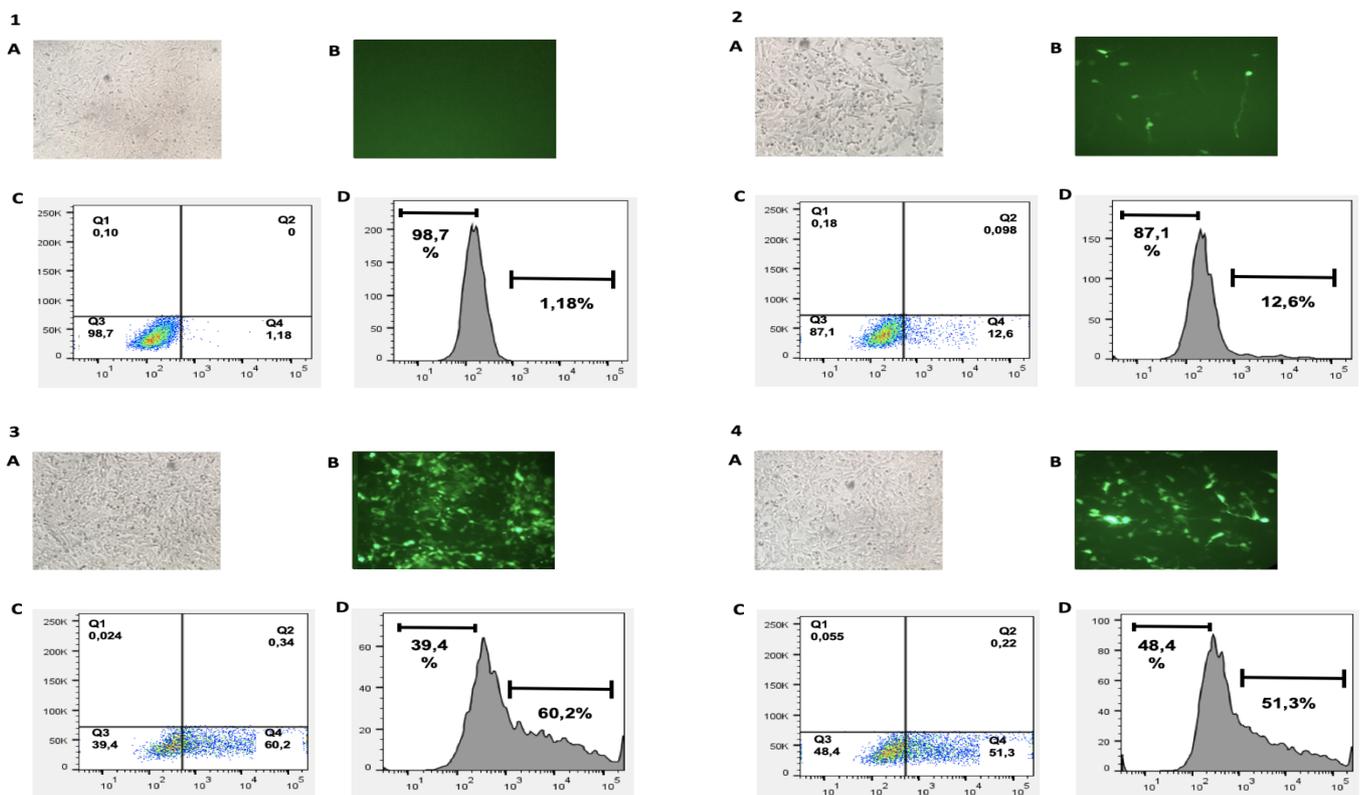


Figure 1. 1- Control group (without DNA and lipofectamine) A and B - microscopy photographs under inverted microscope and fluorescence. The left images were taken with white light and right with fluorescent light on the L5 filter; C- Dotplot representative of the cells transfected with the vector pMEG-GFP; D- Histogram indicative of the percentage of neuronal cell transfection. 2- Transfection with 0.5 μ g of DNA and 2 μ L of lipofectamine. A and B - microscopy photographs under inverted microscope and fluorescence. The left images were taken with white light and right with fluorescent light on the L5 filter; C- Dotplot representative of the cells transfected with the vector pMEG-GFP; D- Histogram indicative of the percentage of transfection of cells. 3 - Transfection with 1 μ g DNA and 2 μ L lipofectamine A and B - microscopy photographs under inverted microscope and fluorescence. The left images were taken with white light and right with fluorescent light on the L5 filter; C- Dotplot representative of the percentage of cells transfected with the vector pMEG-GFP; D- Histogram indicative of the percentage of transfection of cells. 4- 2 μ g DNA and 2 μ L lipofectamine A and B - microscopy photographs under inverted microscope and fluorescence. The left images were taken with white light and right with fluorescent light on the L5 filter; C- Dotplot of the cell base of transfection of neuronal cells; D- Histogram indicative of the percentage of transfection of cells.

The SH-SY5Y were transfected with the pCDH-puro vector containing the ZIKV protein. The expressions of Env, prM, Cap, NS1, NS2B, NS3, NS4B and NS5 were confirmed by indirect immunofluorescence at 48h post-transfection. The results revealed that these proteins were expressed and localized in the nucleus and cytoplasm of transfected SH-SY5Y cells (**Figure 2 and 3**).

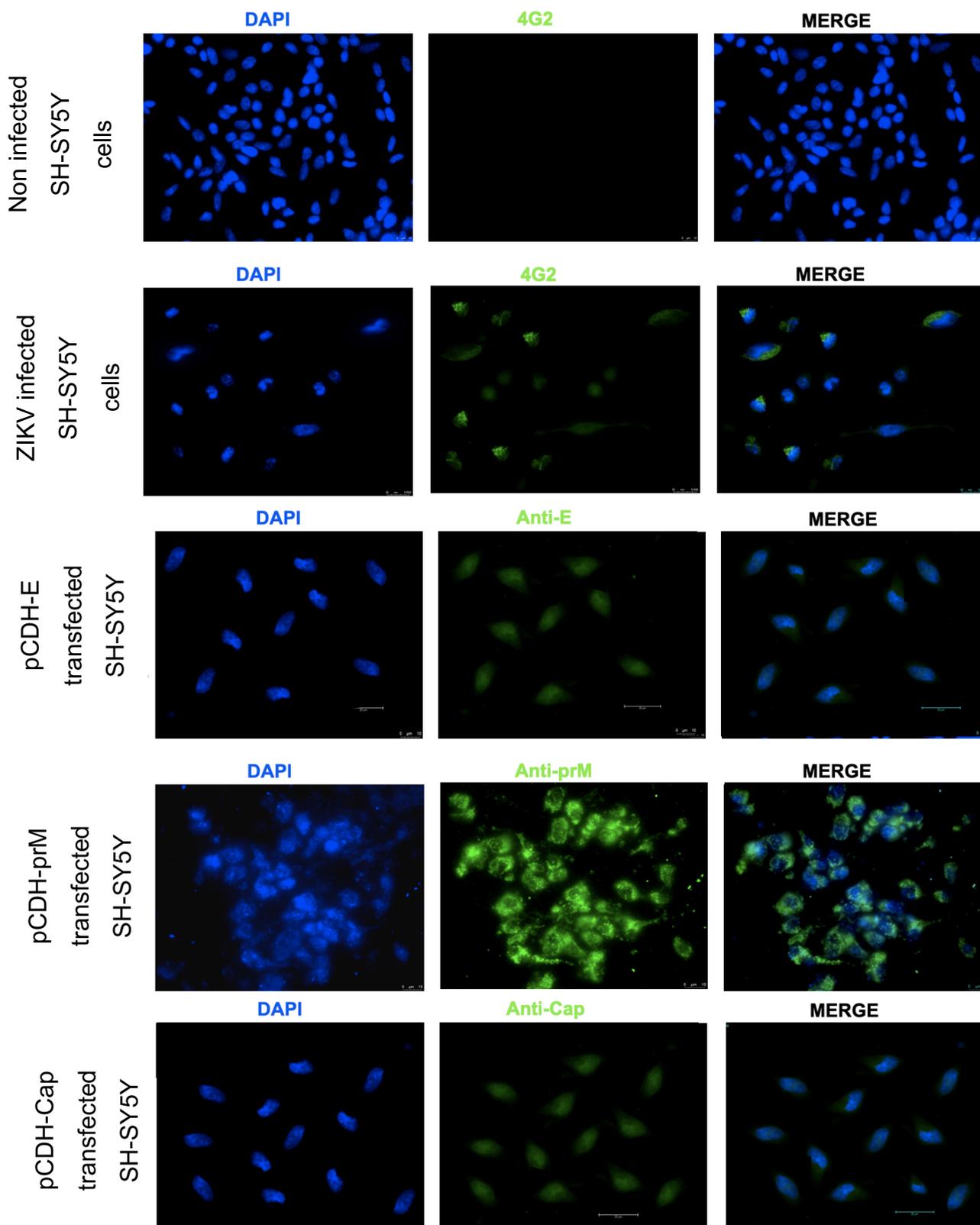


Figure 2. Immunofluorescence staining of non-infected and infected SH-SY5Y cells and E, prM and Cap transfected SH-SY5Y cells 48h post-transfection. The 3 columns within each set of 9 panels correspond to staining with DAPI stain for cell nuclei (“DAPI”, staining dark blue, column 1) a monoclonal antibody against the envelope flavivirus protein (second line) and the E, prM, Cap, proteins respectively (Anti-E, Anti-prM, Anti-Cap, staining green, column 2) and the merged images (“merge” column 3).

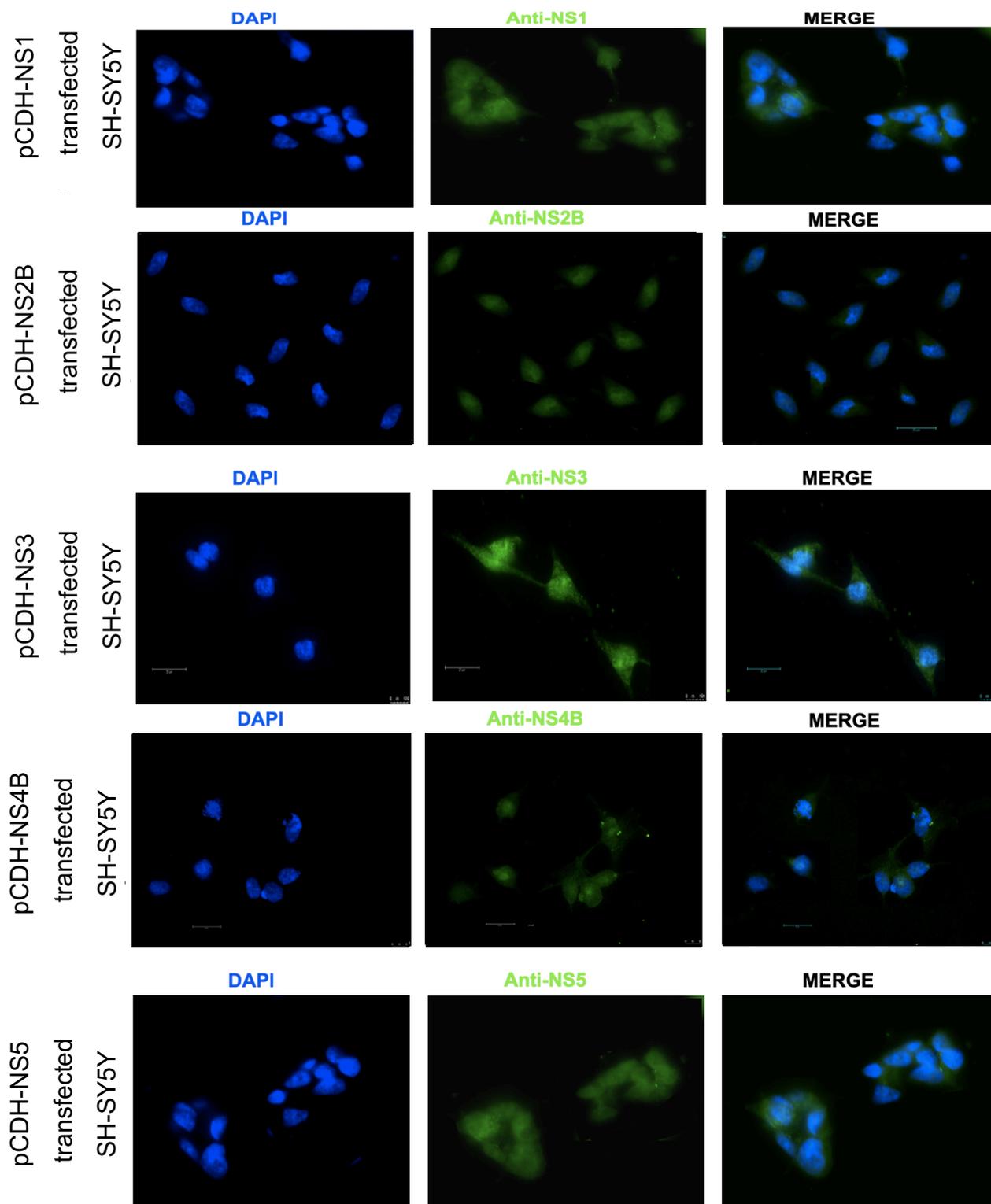


Figure 3. Immunofluorescence staining of non-infected and infected SH-SY5Y cells and NS1, NS2B, NS3, NS4B, and NS5 transfected SH-SY5Y cells 48h post-transfection. The 3 columns within each set of 15 panels correspond to staining with DAPI stain for cell nuclei (“DAPI”, staining dark blue, column 1) a monoclonal antibody against the NS1, NS2B, NS3, NS4B and NS5 proteins respectively (Anti-NS1, Anti-NS2B, Anti-NS3, Anti-NS4B and Anti-NS5 staining green, column 2) and the merged images (“merge” column 3).

ZIKV infection mediated downregulation of Cdc20 in infected SH-SY5Y cells

Cell supernatants and cells were collected at 24, 48, 72 and 96h post-infection to assess the expression of Cdc20 in infected SH-SY5Y cells using Western blot analysis. The results showed that they were still detectable in the 24h post infection in cell lysates (Figure 4). While the infection proceeds it is possible to observe that there is decrease in the expression of the Cdc20 protein, in 96h post-infection no protein detection of was observed in the cell lysate.

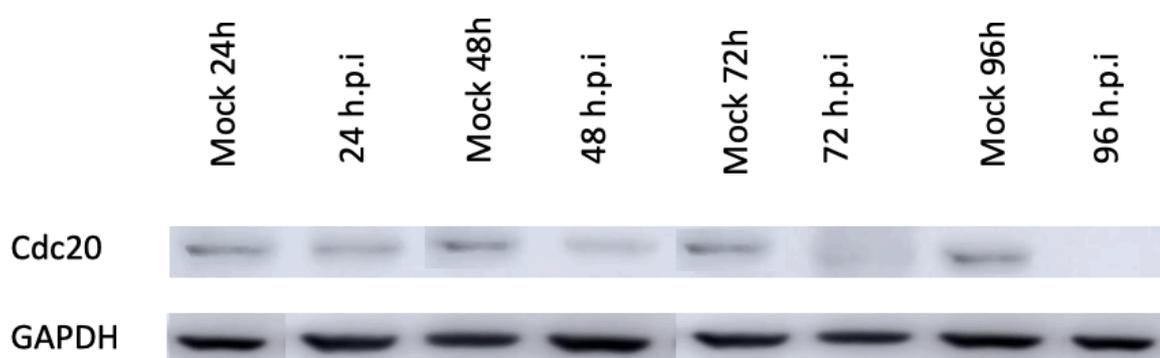


Figure 4. ZIKV infection downregulates the expression of Cdc20, over the time, in infected SH-SY5Y cells. 24, 48, 72, 96h post-infection the cells were collected for Western blot analysis for Cdc20 expression in infected SH-SY5Y cells using anti-Cdc20 monoclonal antibody. Band intensity normalization was performed using GAPDH protein levels as endogenous control. Data are representative of three experiments.

Plasmids pCDH-E and pCDH-prM mediated downregulation of Cdc20 in transfected SH-SY5Y cells

To examine the effect of ZIKV proteins on the expression of Cdc20 Western blot analysis was performed at 48 post-transfection. The results showed that cells transfected with E and prM plasmid presented significantly decrease in the Cdc20 expression and in the other groups no significantly alteration was observed.

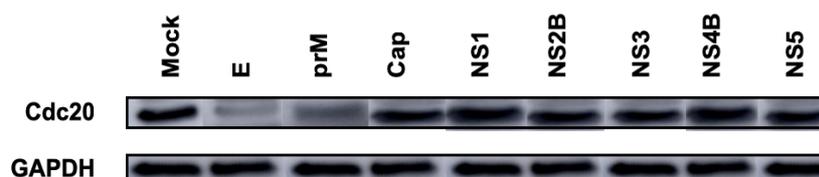
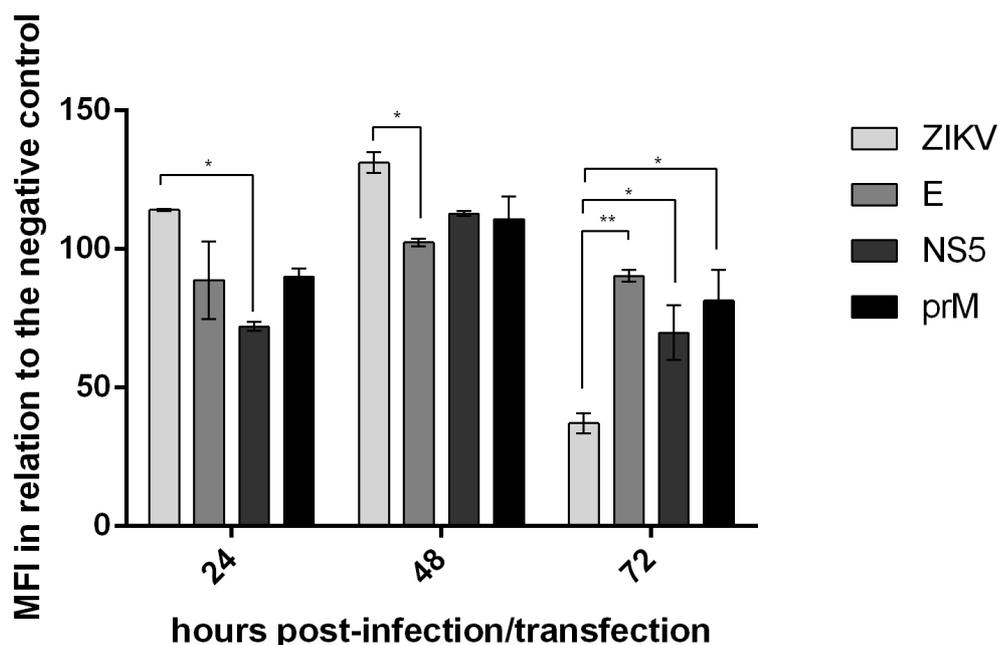


Figure 5. E and prM proteins downregulate the expression of Cdc20 in transfected SH-SY5Y cells. Transfected SH-SY5Y with pCDH-E, pCDH-prM, pCDH-Cap, pCDH-NS1, pCDH-NS2B, pCDH-NS3, pCDH-NS4B or pCDH-NS5 vectors. After 48h of incubation, cells were collected for Western blot analysis for Cdc20 expression in transfected SH-SY5Y cells, using anti-Cdc20 monoclonal antibody. Band intensity normalization was performed using GAPDH protein levels as endogenous control. Data are representative of three experiments.

ZIKV infection and transfection with pCDH-NS5 inhibits the proliferative capacity of SH-SY5Y cells

To examine the effect of ZIKV infection or transfection with pCDH-E, pCDH-prM and pCDH-NS5 on the proliferative profile of SH-SY5Y cells, flow cytometry analysis with specific labeling for Ki67, nuclear protein used as marker of cell proliferation. According to the results presented in the period 24h post infection / transfection there was a significant difference in MFI only between the infected group when compared to the NS5 group. The analysis of the groups in the 48h time reveals, curiously, that there was a significant increase in the MFI of the infected group, being possible to observe also a significant difference in the MFI of the group E with the infected group. In the last analyzed period, it was observed that there was a reduction in MFI in all the studied groups, and it is possible to highlight the significant difference between the NS5 and prM groups with the infected group, being more evident the difference of MFI between the infected group and the group E (E, NS5, prM), a moderate increase in MFI occurs suggesting that there is a basal proliferation of these cells even when infected / transfected. However, on the third day there is a reduction of MFI in all groups, but only with significant values in the infected group and NS5, indicating that the virus and the NS5 protein reduce the proliferation in this cell line, from the second day.



Proliferative profile of infected or transfected SH-SY5Y cells based on the mean fluorescence intensity of the FITC-conjugated anti-Ki67 monoclonal antibody. The results are presented in relation to the negative control. Statistical significance was determined by 2-way ANOVA using the Bonferroni multiple comparisons test and confidence interval at * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) and **** ($p < 0.0001$) as compared to the control group (uninfected) at each respective point or as indicated. Results are presented as the mean \pm standard deviation of three biological replicates.

Discussion

ZIKV is an emerging arbovirus and has gained international repercussion in recent years becoming one of the most studied flaviviruses in the scientific community. Recent epidemic outbreaks in Central and South America and the unexpected association between ZIKV infection and neurological changes in neonates have attracted global attention on the need to study and understand the mechanisms of viral pathogenesis associated with cases of Congenital Zika and possible mechanisms of therapeutic intervention.

The ability of the virus to infect and replicate in neural progenitor cells (LI et al., 2016; MING et al., 2016; TANG et al., 2016; ROTHAN et al., 2018) is well documented in the literature, impairing the vital functions of these cells as and cell proliferation (LI et al., 2016; LI et al., 2018) and leading to cell death by apoptosis (CUGOLA et al., 2016; to 2016, HUANG et al., 2016, SLOMNICKI et al., 2017) and autophagy (LIANG et al., 2016, CHIMAREL et al., 2018). In a study conducted by Liang et al. (2016), the researchers analyzed which genes were up and down-

regulated on neural progenitor cells infected with ZIKV and observed a significant reduction in Cdc20 gene expression, thereby confirming that the virus interferes with the growth and differentiation of this cell line.

The first step of the work was to perform a molecular characterization of these vectors to confirm the identity of the inserts. Regarding the characterization data of the pCDH plasmids it was possible to confirm that they showed the cloned ZIKV genes individually at the cloning sites of the vectors. The ten vectors were digested with specific endonuclease enzymes and released fragments of the expected size for each gene as expected. After confirmation the vectors had the inserts sequenced and the sequences obtained were used to search for homology with the sequence deposited in the BLAST, thereby confirming that the inserts are the ZIKV genes, African strain.

Because SH-SY5Y cells are sensitive and have similar characteristics to neurons (SHIPLEY et al., 2016), they do not support any method of exogenous DNA transfection. In this way some standardizations were required to transfect the SH-SY5Y cells by lipofection using the plasmid vector pMEG-GFP. The GFP gene was chosen for its ease in detecting the transfected cells by expression of GFP, fluorescent protein without endogenous expression. The functionality of the technique was confirmed by the efficient transfection in the cells of this lineage in which the following criteria were evaluated: three DNA concentrations (0.5, 1 and 2 μ g); two volumes of lipofectamine (2 and 3 μ L); two post-transfection periods (24 and 48h) for the standardization of the technique. Among the analyzed parameters, the best results were observed with 1 μ g of DNA, 2 μ L of lipofectamine with 48h after transfection with approximately 60% of the transfected cells.

Once the conditions of transfection were established, transfection was started using the vectors with the ZIKV inserts, which was the real objective of this work. To confirm transfection using the pCDH plasmids an immunofluorescence assay was performed to verify the expression of the ZIKV proteins. With the results of immunofluorescence, it can be observed that transfection with pCDH was efficient, since viral proteins were expressed in all analyzed groups (E, prM, Cap, NS1, NS2B, NS3, NS4B and NS5) (Figure 26 and 27) corroborating with similar results obtained by Liang et al. (2016).

Our results found Cdc20 with decreased expression in infected SH-SY5Y cells. By analyzing the immunoblotting membrane it is possible to observe that after 48 hpi there is already a decrease in the protein expression of Cdc20 obeying an inversely

proportional kinetics with the infection, that is to say, as the infection progresses in the infected cells the levels of Cdc20 decrease with the passage of time reaching levels not detected at 96 hpi, whereas expression of Cdc20 in the control group (uninfected cells) remained stable during the same period. This result is shown in agreement with the literature, where Bennet et al-. (2019) analyzing data on gene expression of pluripotent stem cells against ZIKV infection observed decreased levels of Cdc20 and with other proteins related to cell cycle regulation and apoptosis.

It was observed that from 48 hpi was possible to observe reduction of Cdc20 in infected SH-SY5Y cells. In the transfection experiment, only the group transfected with the plasmids for E and prM proteins showed a significant decrease in the expression of Cdc20.

Considering the results that showed possible interaction of the structural proteins (E and prM) with the Cdc20, it was decided to evaluate if these proteins were able to alter the proliferative profile of SH-SY5Y cells. To our surprise, none of the structural proteins (E and prM) analyzed significantly decreased the proliferative rate of cells. The results that presented statistical significance were of the group transfected with NS5 on the 3rd day after transfection.

When analyzed the graph over the three days it is possible to verify that between 24 and 48h a basal increase occurs in the proliferation of the cells indicating that in the first days of infection / transfection the cell still maintains its proliferative capacity, occurring a significant decrease from the third day . However when analyzing the inhibition of the proliferation of proteins (E, prM and NS5) with the virus per se, it is observed that none of them is able to drastically reduce proliferation at the same level as the virus.

Therefore, the results of this work point out that some viral proteins interact with host cell proteins disrupting the cell cycle and consequently deregulating cell proliferation. These data may indicate the relationship between ZIKV infection and impairment of neuronal cell development, which in some cases could explain the neurocytotoxicity of the virus.

Acknowledgements

We thank Dr. Jae U. Jung (Department of Molecular Microbiology and Immunology) for providing the vector pCDH. We also thank the staff at the IAM technical assistance.

Funding

This study was financially supported by Zika Fast Track Project, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) and We also thank CAPES for the financial support.

Competing Interest

The authors have declared that no competing interest exists.

References

1. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009;5(4):318–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>
2. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al–. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):1–10.
3. Yun S-I, Lee Y-M. Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 4];55(3):204–19. 4. Zanoluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
5. Marcondes CB, Ximenes M de FF de M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by aedes (*Stegomyia*) mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):4–10.
6. Ventura C V., Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R. Zika virus in Brazil and

- macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet*. 2016;387(10015):228.
7. Teixeira MG, Da Conceição N Costa M, De Oliveira WK, Nunes ML, Rodrigues LC. The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: Detection, control, etiology, and future scenarios. *Am J Public Health*. 2016;106(4):601–5.
 8. de Araújo TVB, Ximenes RA de A, Miranda-Filho D de B, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, et al–. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2017;3099(17):1–9.
 9. Souza WV de, Araújo TVB de, Albuquerque M de FPM, Braga MC, Ximenes RA de A, Miranda-Filho D de B, et al–. Microcephaly in Pernambuco State, Brazil: epidemiological characteristics and evaluation of the diagnostic accuracy of cutoff points for reporting suspected cases. *Cad Saude Publica [Internet]*. 2016;32(4):e00017216.
 10. Medin CL, Rothman AL. Zika Virus The Agent and Its Biology, With Relevance to Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141.
 11. Hasan SS, Sevana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol [Internet]*. 2018;25(1):13–20. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41594-017-0010-8>
 12. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487–524.
 13. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, Prager BC, et al–. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med*. 2017;
 14. Kong W, Li H, Zhu J. Zika virus: The transboundary pathogen from mosquito and updates. *Microb Pathog [Internet]*. 2018;114(December 2017):476–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017311658>
 15. Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*. 2017;21(2):134–42.
 16. Zhang F, Hammack C, Ogden SC, Cheng Y, Lee EM, Wen Z, et al–. Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(18):8610–20.
 17. Krause KK, Azouz F, Shin OS, Kumar M. Understanding the Pathogenesis of Zika Virus Infection Using Animal Models. *Immune Netw*. 2017;
 18. Chaudhary V, Yuen K-S, Chan JF-W, Chan C-P, Wang P-H, Cai J-P, et al–. Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *J Virol*. 2017;

19. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, et al-. 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*. 2016;
20. Ki-Jun Yoon GS, Xuyu Qian HZ, Hongjun Song GM. Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Press*. 2017;
21. Onorati M, Li Z, Liu F, Sousa AMM, Nakagawa N, Li M, et al-. Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Rep*. 2016;16(10):2576–93.
22. Ramos Da Silva S, Cheng F, Gao S-J. ZIKV-Host Interactions. In 2018.
23. Garcez PP, Nascimento JM, De Vasconcelos JM, Madeiro Da Costa R, Delvecchio R, Trindade P, et al-. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci Rep*. 2017;7:1–10.
24. Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LAR, et al-. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6(1):39775. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep39775>
25. Missé D, Diop F, Wichit S, Busso C, Gönczy P, Ferraris P, et al-. Zika virus causes supernumerary foci with centriolar proteins and impaired spindle positioning. *Open Biol*. 2017;7(1):160231.

Supplementary Material

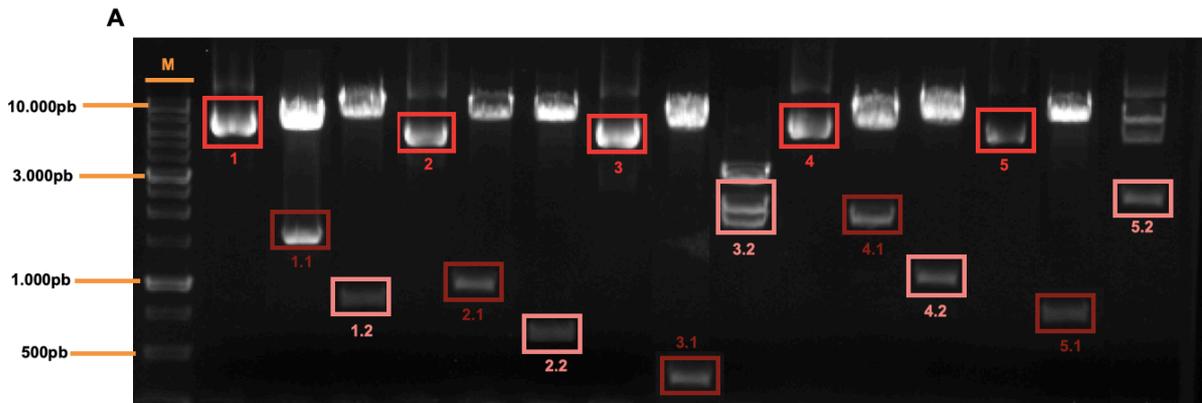


Figure 1. 1, 2, 3, 4, 5- constructs pCDH-E, pCDH-prM, pCDH-Cap, pCDH-NS1, pCDH-NS2A, respectively, undigested; 1.1 - pCDH-E construct digested with NotI and NheI cloning enzymes, the digestion of the clones with the enzymes presented as bands 7354 and 1519pb corresponding to the vector and the insert; 1.2- XbaI confirmatory enzyme digested pCDH-E construct presented as 8046 and 827bp size bands; 2.1-construct pCDH-prM digested with NotI and NheI cloning enzymes, a digestion of the clones with the enzymes presented as bands 7354 and 511pb corresponding to the vector and the insert; 2.2- pCDH-prM construct digested with the confirmatory enzyme XbaI presented as bands with size 7583 and 282bp; 3.1 - pCDH-Cap construct digested with the BamHI and XbaI cloning enzymes, a digestion of the clones with the enzymes presented as bands 7357 and 372bb corresponding to the vector and the insert; 3.2- BglII confirmatory enzyme-digested pCDH-Cap construct presented as bands of size 3424, 2288 and 1910pb; 4.1 - pCDH-NS1 construct digested with the BamHI and XbaI cloning enzymes, a digestion of the clones with the enzymes presented as bands 7357 and 1062 bp corresponding to the vector and the insert; 4.2- pCDH-NS1 construct digested with confirmatory enzyme Sall presented as bands with size 6597 and 1822; 5.1 construct pCDH-NS2A digested with BamHI and XbaI cloning enzymes, a digestion of the clones with the enzymes presented as bands 7357 and 684 bp corresponding to the vector and the insert; 5.2- pCDH-NS2A construct digested with the confirmatory enzyme SphI presented as bands with size 5539 and 2502; M- 1Kb Plus DNA Ladder Marker (New England Biolabs®) 1% agarose stained agarose stained with ethidium bromide.- Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs®) gel de 1% agarose corado com brometo de etídio.



Figura 2. 6, 7, 8, 9, 10- constructs pCDH-NS2B, pCDH-NS3, pCDH-NS4A, pCDH-NS4B and pCDH-NS5, respectively, undigested; 6.1- pCDH-NS2B construct digested with the BamHI and XbaI cloning enzymes, the digestion of the clones with the enzymes presented the 7357 and 396 bp bands corresponding to the vector and to the insert; 6.2- pCDH-NS2B construct digested with PstI confirmatory enzyme presented bands with size 7501 and 252bp; 7.1- pCDH-NS3 construct digested with the BamHI and XbaI cloning enzymes, the digestion of the clones with the enzymes presented the bands with size 7357 and 1851b corresponding to the vector and to the insert; 7.2- pCDH-prM construct digested with SphI confirmatory enzyme presented the bands with size 5676 and 3538bp; 8.1 - pCDH-NS4A construct digested with the BamHI and XbaI cloning enzymes, the digestion of the clones with the enzymes presented the bands with size 7357 and 456pb corresponding to the vector and to the insert; 8.2- construct pCDH-NS4A digested with BglII confirmatory enzyme presented the bands with size 3424, 2409 and 1873pb; 9.1- pCDH-NS4B construct digested with the BamHI and XbaI cloning enzymes, digestion of the clones with the enzymes showed the bands with size 7357 and 759pb corresponding to the vector and the insert; 9.2- SacI confirmatory enzyme-digested pCDH-NS4B construct presented bands with size 3424, 2089 and 1754; 10.1- pCDH-NS5 construct digested with the NheI and NotI cloning enzymes, the digestion of the clones with the enzymes presented the bands with size 7354 and 2718pb corresponding to the vector and to the insert; 10.2- construct pCDH-NS2A digested with confirmatory enzyme XbaI presented the bands with size 8504 and 2718; M- 1Kb Plus DNA Ladder Marker (New England Biolabs®) 1% agarose stained agarose stained with ethidium bromide.

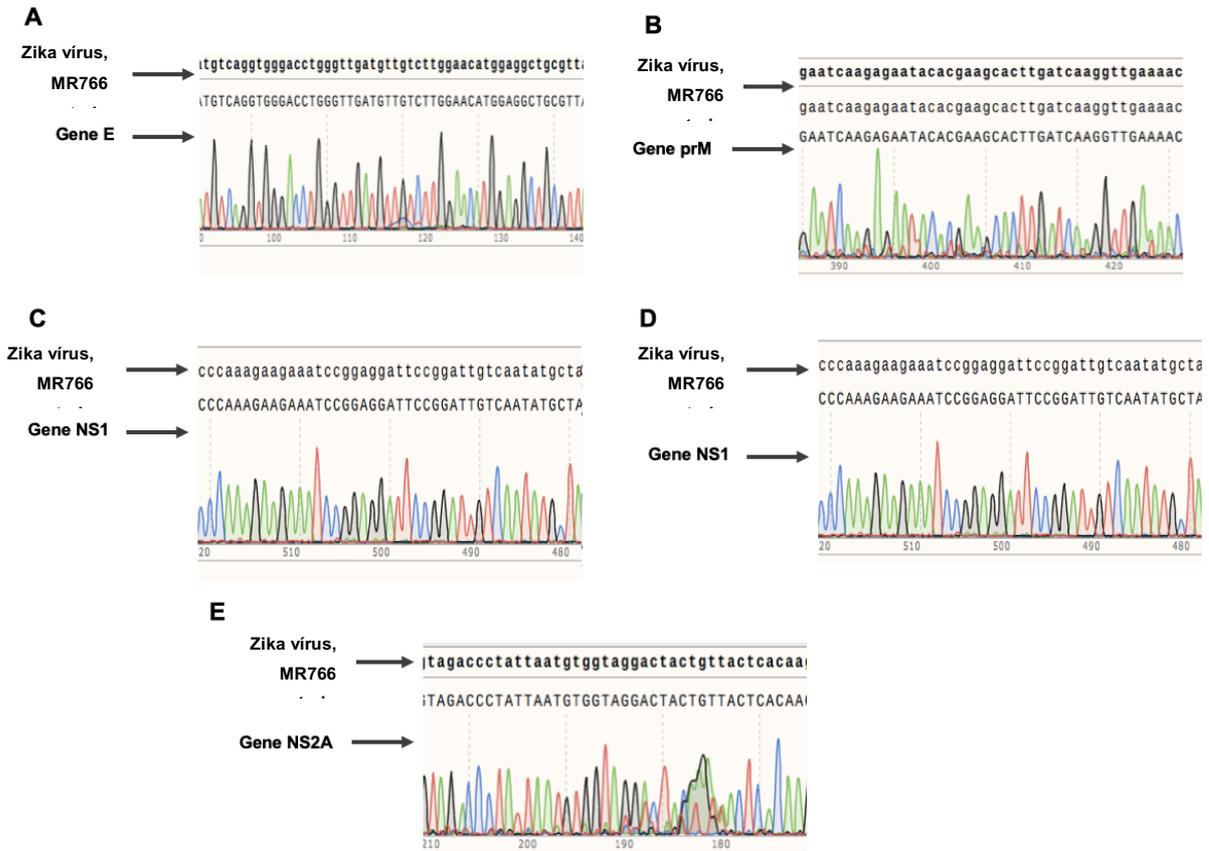


Figure 3. **A-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the E gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F, pCDH-R, InterE-F and Inter-R; **B-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the prM gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R; **C-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the Cap gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R; **D-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by NS1 gene sequencing inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R; **E** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the NS2A gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R.

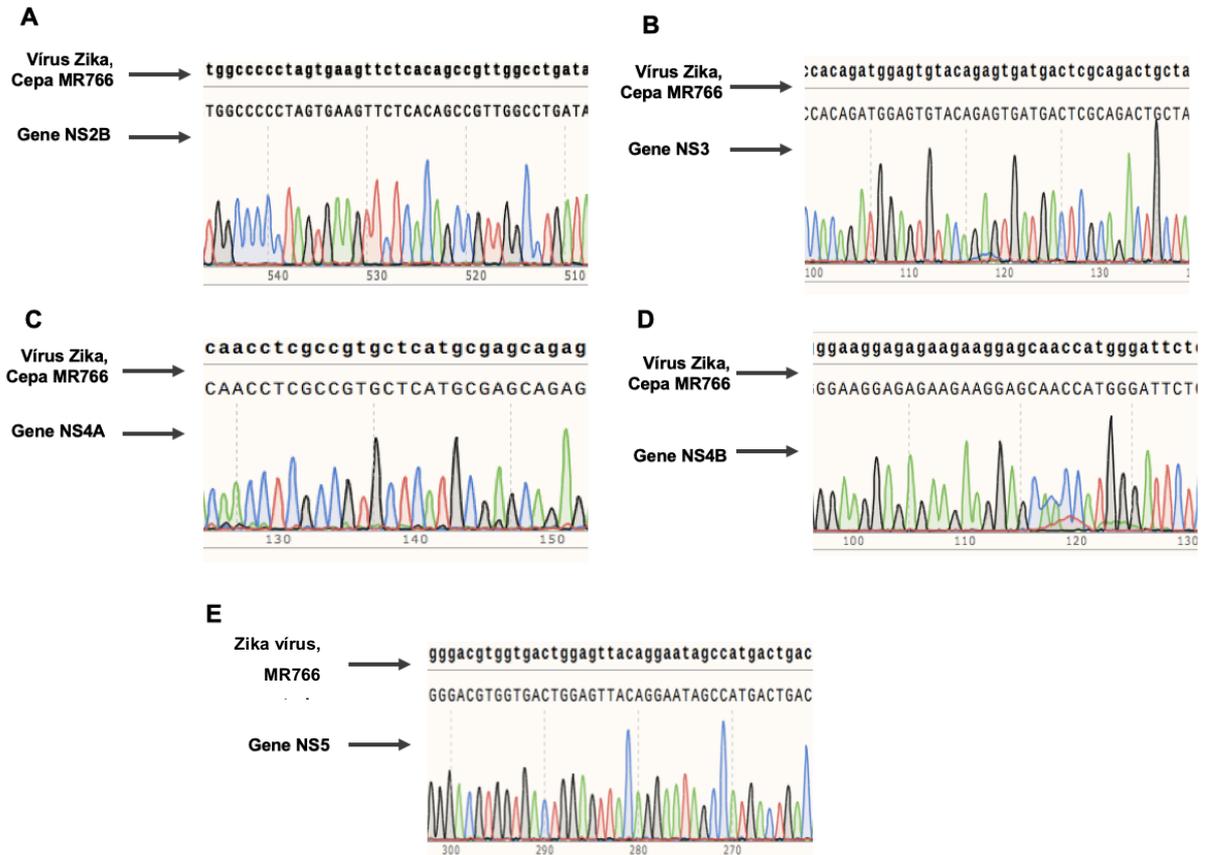


Figure 4. A- Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the NS2B gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R; **B-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by NS3 gene sequencing inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F, pCDH-R, InterNS3-F and InterNS3-R; **C-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the NS4A gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R; **D-** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the NS4B gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F and pCDH-R; **E** Partial electropherogram representing part of the sequence obtained by sequencing the NS5 gene inserted into the pCDH vector using primers pCDH-F, pCDH-R, InterNS5-F and InterNS5-R.