

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

THAIS MELQUIADES DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA NÃO-
ESTRUTURAL 5 (NS5) DO VÍRUS ZIKA EM CÉLULAS HEK293T**

RECIFE

2020

THAIS MELQUIADES DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA NÃO-
ESTRUTURAL 5 (NS5) DO VÍRUS ZIKA EM CÉLULAS HEK293T

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

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- L732c Lima, Thais Melquiades de.
 Caracterização do perfil de interação da proteína não-estrutural 5 (ns5) do vírus zika em células HEK293T/ Thais Melquiades de Lima. — Recife: [s.n.], 2020.
 120 p.: il., tab., graf.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.
 Orientador: Rafael Freitas de Oliveira França.
1. Arbovírus. 2. Vírus zika. 3. Ultraestrutura. 4. Mapas de Interação de Proteínas. I. França, Rafael Freitas de Oliveira. II. Título.

THAIS MELQUIADES DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA NÃO-
ESTRUTURAL 5 (NS5) DO VÍRUS ZIKA EM CÉLULAS HEK293T

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: 20/02/2020

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

Dr. Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia
Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Rafael Franca, pela oportunidade, conhecimento transmitido e confiança para a realização deste trabalho. As suas críticas, discussões e sugestões foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa por estarem comigo todos os dias, pela amizade construída, pelo conhecimento compartilhado, pelos conselhos e momentos, agradeço a vocês: Amanda, Armando, Elisa, Gabi, Irassandra, Leila, Lucas, Morganna, Pedro, Renan, Sayonara e Thaíse.

Aos companheiros de laboratório e departamento Ada, Bruno, Débora, Fábria, Fernando, Paulo, Suelen, Tallyta, Verônica e Willyenne. Obrigada pelo apoio, conhecimento e carinho.

Em especial a Gustavo e Elidianne, pela amizade e por toda ajuda e colaboração em várias etapas nos experimentos.

Aos amigos que a pós-graduação me deu: Catarina, Janderson, Sthephanny e Yallen, obrigada pelo apoio, amizade e pela ajuda nas disciplinas.

Aos meus amigos de vida (Bruna, Débora, Loueine, Nyelle e Talyne) que sempre estiveram comigo e me incentivaram nessa etapa.

A todos os professores e pesquisadores que me conduziram de alguma forma princípios pessoais e científicos que instigou minhas escolhas e pesquisa.

A minha família, especialmente a meu pai Elias, minha mãe Adeilda e meu irmão Túlio por todo apoio e suporte.

A FACEPE, ao Instituto Aggeu Magalhaes, a Secretaria Acadêmica e ao Departamento de Virologia e Terapia Experimental pelo suporte financeiro, técnico e estrutural para a execução deste trabalho.

A todos, meu muito obrigado.

LIMA, Thais Melquiades de. **Caracterização do perfil da interação da proteína não-estrutural 5 (NS5) do vírus Zika em células HEK293T**. 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é considerado um arbovírus emergente, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Está associado ao aumento da ocorrência de complicações neurológicas e autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré, e a Síndrome Congênita do Zika. Apresenta RNA genômico de cadeia simples positivo, que codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais, do capsídeo (C), precursora da membrana (prM) e do envelope (E), e em sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Conhecidamente, a proteína não-estrutural 5 desempenha importante papel na replicação do RNA viral e na inibição da resposta imune inata, além de apresentar-se de forma compartimentalizada no núcleo, seus mecanismos e interações ainda não estão totalmente compreendidos. Portanto, dá-se a devida importância em validar a investigação acerca da distribuição intracelular bem como a interação das proteínas virais em células infectadas, buscando assim entender os mecanismos replicativos do ZIKV e a compartimentalização da NS5. Foi observado que a localização da proteína NS5 está presente na fração nuclear da célula, e que elas interagem com proteínas envolvidas no processamento de RNA, transcrição, tradução, transporte de proteínas, ciclo celular, imunidade e enzimas metabólicas. Portanto, são necessários mais estudos para elucidar a função desses novos alvos da NS5 durante a infecção. Sendo assim, este trabalho revelou aspectos relacionados a função e localização desta proteína em células embrionárias.

Palavras-chaves: Arbovírus. Vírus zika. Ultraestrutura. Mapas de Interação de Proteínas.

LIMA, Thais Melquiades de. **Characterization of the interaction profile of non-structural protein 5 (NS5) of the Zika virus in HEK293T cells.** 2020. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) – Institute Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an emergent arbovirus which belongs to the family Flaviviridae and to the genus Flavivirus. It is associated with an increase in the occurrence of neurological and autoimmune complications, such as Guillain-Barré syndrome, and Zika Congenital Syndrome. It has positive single-stranded genomic RNA, which encodes a polyprotein that is cleaved into three structural proteins, capsid (C), membrane precursor (prM) and envelope (E), and seven non-structural proteins, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5. The Non-structural protein 5 plays an important role in the replication of viral RNA and inhibition of the innate immune response, besides being compartmentalized in the nucleus, their mechanisms and interactions are still not fully understood. Therefore, it is necessary to validate the investigation about the intracellular distribution as well as the interaction of the viral proteins in infected cells and consequently facilitating the understanding of the replicative mechanisms of ZIKV and the compartmentalization of NS5. It was observed that the location of the NS5 protein is present in the nuclear fraction of the cell and that they interact with proteins involved in RNA processing, transcription, translation, protein transport, cell cycle, immunity and metabolic enzymes. Therefore, further studies are needed to elucidate the function of these new NS5 targets during infection. Therefore, this work revealed aspects related to the function and location of this protein in embryonic cells.

Key words: Arbovirus. Zika virus. Ultrastructure. Protein Interaction Maps

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1. Áreas endêmicas do ZIKV.....	18
Ilustração 2. Figura esquemática de bebê com tamanho cefálico normal e bebê com microcefalia.....	23
Ilustração 3. Organização do genoma do ZIKV	26
Ilustração 4. Estrutura tridimensional da NS5 do ZIKV.....	28
Ilustração 5. Sequências envolvidas na regulação da localização subcelular da proteína NS5	29
Ilustração 6. Representação esquemática do complexo de replicação dos flavivírus.....	31
Ilustração 7. Ciclo de vida do flavivírus e mecanismo de fusão.....	32
Ilustração 8. Representação esquemática das vias de indução e sinalização do Interferon do tipo 1.....	34
Ilustração 9. Representação do plasmídeo pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 contendo o gene da proteína NS5.....	44
Ilustração 10. Representação do Vetor NS5-eYFP-pCDNA contendo o gene da proteína NS5 e a proteína fluorescente amarela (eYFP).....	44
Ilustração 11. Perfil da titulação por formação de placa (PFU).....	51
Ilustração 12. Eletroforese dos plasmídeos pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 amplificados.....	52
Ilustração 13. Eletroforese dos plasmídeos NS5-eYFP-pCDNA amplificados.....	52
Ilustração 14. Simulação do perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5.....	53
Ilustração 15. Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 obtida.....	54
Ilustração 16. Simulação do perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do NS5-eYFP-pCDNA.....	55
Ilustração 17. Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do NS5-eYFP-pCDNA.....	55
Ilustração 18. Eletroferograma parcial do sequenciamento do gene NS5 da cepa africana... ..	56
Ilustração 19. Eletroferograma parcial do sequenciamento do gene NS5 da cepa Natal RGN.....	56
Ilustração 20. Análise da expressão da proteína NS5 em células HEK293T transfectadas com plasmídeo pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 e infectadas.....	57

Ilustração 21. Análise da expressão da proteína NS5 em células HEK293T transfectadas com plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.....	58
Ilustração 22. Fluorescência indireta em células HEK293T utilizando o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.	59
Ilustração 23. Análise da expressão da proteína NS5 em lisados celulares precipitados.....	60
Ilustração 24. Análise da expressão da proteína NS5 em lisados celulares precipitados.....	60
Quadro 1. Oligonucleotídeos externos e internos utilizados na amplificação do gene da NS5 do plasmídeo pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5.....	47
Quadro 2. Oligonucleotídeos externos e internos utilizados na amplificação do gene da NS5 do plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.....	47
Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

CHIKV	Vírus da chikungunya
DENV	Vírus da dengue
dsRNA	RNA de fita dupla
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon do tipo I
IL-2	Interleucina 2
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IRF3	Fator 3 de resposta do interferon
ISG	Genes estimulados por interferon
JAK1	Janus kinase 1
JEV	Vírus da encefalite japonesa
LB	Meio Luria-Bertani
MAVS	Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
MDA5	Gene 5 associado à diferenciação de melanoma
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MOI	Multiplicidade da infecção
MTase	Metiltransferase
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Quadro aberto de Leitura
PBS	Tampão fosfato salino
PFU	Unidades formadoras de placas
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	Gene induzido por ácido retinoico
RLR	Receptor tipo RIG-I
SCZ	Síndrome congênita do vírus Zika
SFB	Soro Fetal Bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
ssRNA	RNA de fita simples
STAT2	Transdutor de sinais e ativador da transcrição 2

STAT6	Transdutor de sinais e ativador da transcrição 6
TBK1	Quinase TANK-ligadora tipo 1
TLR	Receptores do tipo “ <i>Toll</i> ”
TNF-α	Fatores de necrose tumoral alfa
UPR	Resposta protéica desdobrada
UTR	Regiões não codificantes
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	18
2.1 História e Epidemiologia do ZIKV	18
2.2 Ecologia e Transmissão	21
2.3 Manifestações clínicas	22
2.3.1 <i>Síndrome Congênita do Zika</i>	23
2.3.2 <i>Síndrome de Guillain-Barré</i>	24
2.3.3 <i>Outras complicações neurológicas</i>	24
2.4 Estrutura e Genoma viral	25
2.5 Proteína não-estrutural 5	27
2.6 Replicação	30
2.7 Resposta Imune Frente à Infecção por Zika	33
2.8 Patogênese	35
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo Geral	40
4.2 Objetivos Específicos	40
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	41
5.1 Local do Experimento	41
5.2 Linhagens Celulares	41
5.2.1 <i>Células VERO (ATCC® CCL81™)</i>	41
5.2.2 <i>Células HEK293T (ATCC® CRL-3216™)</i>	42
5.3 Vírus Zika	42
5.3.1 <i>Identificação da amostra viral</i>	42
5.3.2 <i>Produção do Estoque Viral</i>	42
5.3.3 <i>Titulação do Estoque Viral</i>	43
5.4 Plasmídeos contendo o gene NS5 do ZIKV	43
5.4.1 <i>pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5</i>	43
5.4.2 <i>NS5-eYP-pCDNA</i>	43
5.5 Clonagem	44
5.5.1 <i>Preparação de células DH5α quimicompetentes</i>	45
5.5.2 <i>Transformação</i>	45

5.5.3 Extração plasmidial	46
5.5.4 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição	46
5.5.5 Sequenciamento do Gene.....	46
5.6 Infecção.....	47
5.7 Transfecção	48
5.8 Fluorescência.....	48
5.9 Investigação da expressão da proteína NS5 por Western Blot.....	49
5.10 Imunoprecipitação e espectrometria de massas.....	49
5.11 Aspectos Éticos	50
6 RESULTADOS	51
6.1 Titulação do estoque viral.....	51
6.2 Expansão dos plasmídeos.....	51
6.3 Confirmação dos genes por digestão enzimática.....	53
6.4 Sequenciamento dos genes contidos nos vetores	55
6.5 Análise da expressão da proteína NS5.....	56
6.5.1 Plasmídeo <i>pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5</i>	57
6.5.2 Plasmídeo <i>NS5-eYFP-pCDNA</i>	57
6.6 Fluorescência em células HEK293T	58
6.7 Imunoprecipitação dos complexos proteicos.....	59
6.8 Espectrometria de massas.....	61
7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE A - PROTEÍNAS IMUNOPRECIPITADAS.	93
APÊNDICE B – ARTIGO ELABORADO	106

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) foi recentemente introduzido no Brasil ocasionando uma doença viral aguda apresentando os principais sintomas como febre, artralgia e exantema, sua circulação está diretamente associada ao aumento dos números de casos de microcefalia e de manifestações neurológicas em epidemias ocorridas na América Latina. A sua rápida expansão é devido à eficácia da disseminação e da transmissão do seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (IOOS et al., 2014; LINDENBACH; RICE, 2007).

O ZIKV foi inicialmente isolado em abril de 1947 a partir do soro de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*), localizado na Floresta Zika em Uganda (DICK et al., 1952). Durante décadas foram observadas infecções esporádicas em humanos na África e na Ásia, até que em 2007 ocorreu uma epidemia de febre de Zika na ilha de Yap, Micronésia (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008). Em 2013, houve o relato de uma grande epidemia na Polinésia Francesa. Então a partir disso, o ZIKV tem sido considerado emergente, incluindo atualmente várias áreas com alto risco de infecção (CAO-LORMEAU et al., 2014; IOOS et al., 2014). No Brasil, a epidemia foi descrita no início de 2015, onde foram observados pacientes com sinais clínicos como artralgia, edema de extremidades, febre leve, erupções maculopapulares, dores de cabeça, dor retro orbitária, conjuntivite purulenta, vertigem, mialgia e distúrbios digestivos (CAMPOS et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). Em 2016 foram confirmados 211.770 casos de infecção por Zika no território Brasileiro, com uma incidência de 103,6 por 100 mil habitantes, já em 2018 houve uma diminuição acentuada, sendo observado 7.544 de casos prováveis (BRASIL, 2017, 2018a).

Sua infecção também foi associada ao aumento da ocorrência de complicações neurológicas e autoimunes, tais como a síndrome de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU et al., 2016; ROSÁRIO et al., 2016). Posteriormente, estudos demonstraram que o ZIKV está associado à Síndrome Congênita do Zika, a qual apresenta uma gama de malformações congênitas com amplo espectro clínico, incluindo a microcefalia, ventriculomegalia, calcificações, hipoplasia cerebelar e artrogripose (BRASIL et al., 2016; MELO et al., 2016).

O ciclo de transmissão natural envolve alguns vetores do gênero *Aedes*, como *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus* e *A. aegypti*. Os macacos (HAYES, 2009; MARCHETTE et al., 1969) e os seres humanos são os principais hospedeiros desse vírus. A transmissão pode ocorrer através da picada do vetor artrópode, mas também pode ocorrer através da transmissão sexual, vertical e por transfusões de sangue (DRIGGERS et al., 2016; FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015).

O vírus Zika é considerado um arbovírus emergente, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Apresenta semelhanças com outros membros do gênero, por possuir RNA genômico de cadeia simples positivo, que codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais, do capsídeo (C), precursora da membrana (prM) e do envelope (E), e em sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (ACOSTA et al., 2014; KUNO et al., 1998). Comumente, o ciclo de replicação dos vírus da família *Flaviviridae* ocorre exclusivamente no citoplasma celular (WESTAWAY et al., 1985). De fato, diversos achados da literatura relatam partículas virais maduras em sua maioria no lado externo da membrana nuclear, no aparelho de Golgi, dispersos como inclusão em todo o citoplasma, na superfície e nos espaços extracelulares de células infectadas (CARDIFF et al., 1973; CARDIFF; LUND, 1976; GOULD et al., 1985). No entanto, uma pequena proporção do ciclo replicativo dos vírus Oeste do Nilo, Dengue, vírus da encefalite Japonesa e do vírus Zika foi documentada apresentando-se de forma compartimentalizada no núcleo celular, tal achado se baseia na localização de complexos antigênicos da proteína não-estrutural 5 (NS5) no núcleo (BUCKLEY; GOULD, 1988; HERTZOG et al., 2018; UCHIL et al., 2006). Interessantemente, até o momento poucos estudos relataram a presença de antígenos virais específicos nos núcleos de células de vertebrados e invertebrados infectados com o vírus Zika (BUCKLEY; GOULD, 1988; HERTZOG et al., 2018; KUMAR et al., 2013; PRYOR et al., 2007), estes achados indicam que a localização nuclear e a compartimentalização da NS5 pode desempenhar um papel importante na regulação do processamento do gene nas células hospedeiras (HOU et al., 2017).

Como o maior componente proteico dentro do complexo de replicação do ZIKV, o NS5 desempenha papéis importantes no ciclo de vida e sobrevivência do vírus através dos seus domínios N-terminal metiltransferase (MTase) e C-terminal RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) (DUAN et al., 2017). Ainda possui sinais funcionais de localização nuclear (NLSs), que desempenham o papel principal na translocação nuclear e na replicação de RNA viral (BROOKS et al., 2002; FORWOOD et al., 1999; JOHANSSON et al., 2001; PRYOR et al., 2007). Logo, é considerada uma enzima multifuncional que desempenha importante papel na replicação do RNA viral e na inibição da resposta imune inata. Nos seres humanos, ela antagoniza a resposta do interferon do tipo 1 (IFN-1), promovendo a degradação proteossomal do STAT2 (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Além da depleção de STAT2, também há o bloqueio da fosforilação de STAT1 (HERTZOG et al., 2018). A STAT1 é uma proteína citoplasmática que ativa a sinalização do Interferon do tipo I (SILVENNOINEN et al., 1993).

Portanto, estudos que busquem esclarecer os mecanismos de replicação em células susceptíveis, sua distribuição intracelular bem como a interação das proteínas virais com proteínas dos hospedeiros, são importantes para a melhor compreensão da neuropatogênese das cepas de ZIKV nas atuais epidemias, além de contribuir para o desenvolvimento de potenciais estratégias antivirais destinadas a atenuar a infecção.

Com base nessa abordagem, o presente trabalho propôs analisar a expressão e localização da proteína não-estrutural 5 (NS5) do vírus Zika em células HEK293T, e caracterizar o perfil de interação entre a NS5 com proteínas da célula hospedeira, o que poderia explicar a capacidade do vírus de se replicar, de inibir a resposta imune inata, e de sua interação com fatores de transcrições e proteínas no núcleo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

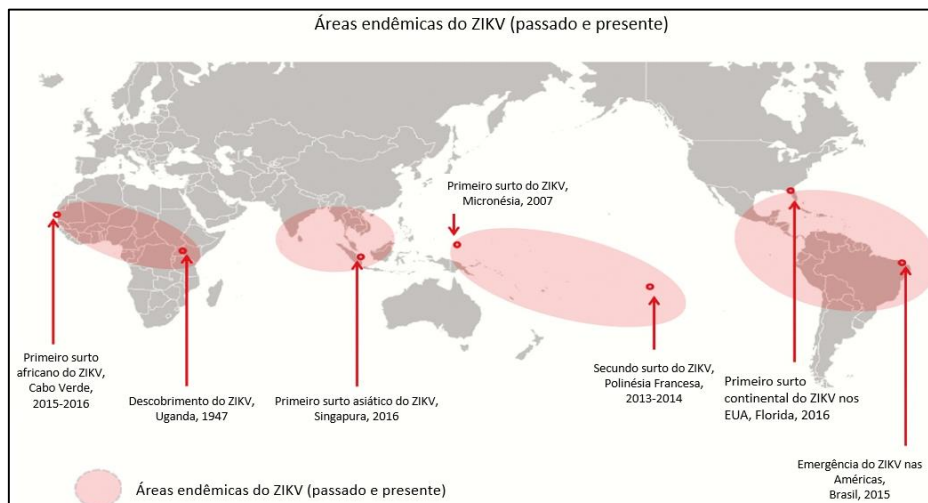
Este tópico apresenta o levantamento teórico sobre os temas abordados no decorrer do trabalho: História e epidemiologia do ZIKV, ecologia e transmissão, manifestações clínicas, estrutura e genoma viral, proteína não-estrutural 5, replicação, resposta imune frente à infecção por Zika e Patogenêse.

2.1 História e epidemiologia do ZIKV

O vírus Zika foi isolado em 1947, a partir de um soro de macaco rhesus na floresta Zika, na península de Entebbe, em Uganda (**Ilustração 1**), durante a vigilância no estudo do vírus da febre amarela (DICK et al., 1952). Chamado de MR-766, este isolado é a cepa protótipo africana do ZIKV. Apesar da prevalência de anticorpos contra o vírus em soros de macacos e isolados virais em mosquitos *Aedes africanus*, não havia relato de doenças na população de Uganda (DICK, 1953; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

Relatos de infecções em humanos foram documentados pela primeira vez em 1954, durante um surto de icterícia na Nigéria, sendo confirmada pelo isolamento do vírus e aumento do título de anticorpos séricos destes pacientes (MACNAMARA, 1954). Até o início do século XXI, poucos casos da doença em humanos foram documentados em países da África e da Ásia (HAYES, 2009), como Uganda (SIMPSON, 1964), Nigéria (FAGBAMI, 1979; MOORE et al., 1975) e Indonésia (OLSON et al., 1981). Além disso, nesses casos a infecção pareceu relativamente leve, autolimitada e não-letal (BEARCROFT, 1956).

Ilustração 1 - Áreas endêmicas do ZIKV.



Fonte: Adaptado de Gubler et al. (2017).

O primeiro grande surto documentado ocorreu em 2007 na Ilha Yap, na Micronésia, localizado a noroeste do oceano Pacífico, no qual houve o relato caracterizado por febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008). Durante a investigação, foi constatado que o soro de alguns pacientes possuía anticorpos IgM contra o vírus da dengue, mas clinicamente a doença era distinta, e cerca de 73% dos residentes acima de 3 anos de idade foram infectados pelo vírus (DUFFY et al., 2009). A partir de 2010 foram observados casos esporádicos de infecção por ZIKV em países do Sudeste Asiático, tais como Tailândia (BUATHONG et al., 2015), Camboja (HEANG et al., 2012), Malásia (TAPPE et al., 2015), Indonésia (KWONG et al., 2013) e nas Filipinas (ALERA et al., 2015).

Entre 2013 e 2014, houve uma grande epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa, localizado no meio do Oceano Pacífico do Sul, com uma população de aproximadamente 270.000 pessoas distribuídas em 67 ilhas (CAO-LORMEAU et al., 2014). Durante este surto, estima-se que 11% da população tenha procurado por tratamento médico com suspeita de infecção por ZIKV (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2014; MUSSO et al., 2014), alguns deles com complicações neurológicas (CAO-LORMEAU et al., 2016; MUSSO et al., 2018; OEHLER et al., 2014). O grande impacto causado foi consequência do baixo nível de imunidade ao Zika e a alta densidade de vetores competentes nessa área (AUBRY et al., 2015). Além das características clínicas observadas no surto de Yap em 2007, pequena porção dos casos graves estava associada com complicações neurológicas, como síndrome de Guillain-Barré ((EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2014; OEHLER et al., 2014), sendo a incidência estimada em cerca de 20 vezes maior que a incidência basal (SEJVAR et al., 2011; OEHLER et al., 2014). Além disso, um estudo de caso-controle detectou anticorpos anti-ZIKV em cerca de 98% dos pacientes com Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU et al., 2016). Apesar da origem do ZIKV na Polinésia Francesa ser desconhecida, ele é geneticamente relacionado às cepas isoladas da Ilha Yap em 2007 e do Camboja em 2010 (CAO-LORMEAU et al., 2014). Sua infecção ainda foi documentada em ilhas próximas no Oceano Pacífico Sul (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014; MUSSO et al., 2014, 2015), incluindo Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015), Ilhas Cook (ROTH et al., 2014) e Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2016), e em outros países distantes, como a Austrália (PYKE et al., 2014), a Itália (ZAMMARCHI et al., 2015a), o Japão (KUTSUNA et al., 2014) e a Noruega (WAEHRE et al., 2014).

A terceira epidemia do ZIKV ocorreu no Brasil, no início de 2015, onde foi detectada a transmissão autóctone do ZIKV na região nordeste do Brasil (CAMPOS et al., 2015;

ZAMMARCHI et al., 2015b; ZANLUCA et al., 2015), estando associada a um surto de doença exantemática aguda (CARDOSO et al., 2015). No final de 2015, o ZIKV foi detectado em pelo menos 18 estados brasileiros, com uma estimativa de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos (HENNESSEY et al., 2016). Os achados laboratoriais indicaram uma infecção não ocasionada pelo DENV e nem pelo vírus Chikungunya (CHIKV), com sinais clínicos como artralgia, edema de extremidades, febre leve, erupções maculopapulares, dores de cabeça, dor retro orbitária, conjuntivite purulenta, vertigem, mialgia e distúrbios digestivos (CAMPOS et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015).

Curiosamente, além das características clínicas já apresentadas em outras epidemias, observou-se um aumento no número de recém-nascidos com microcefalia em áreas afetadas pelo ZIKV até setembro de 2015 (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Estudos retrospectivos na Polinésia Francesa já indicaram um relativo aumento no número de casos de microcefalia e outras anormalidades fetais após o surto de ZIKV entre 2013 e 2014 (CAUCHEMEZ et al., 2016; JOUANNIC et al., 2016). A infecção foi potencializada pela ampla distribuição dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* (MARCONDES et al., 2015).

Em 2016, foram confirmados 211.770 casos de infecção por Zika no território Brasileiro, com uma incidência de 103,6 por 100 mil habitantes, a maioria está concentrada no Estado do Rio de Janeiro, com 67.481 casos. Dos 6 óbitos confirmados por Zika, quatro foram no Rio de Janeiro e dois no Espírito Santo. Também foram registrados 16.864 casos prováveis de infecção em gestantes, sendo 10.769 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial (BRASIL, 2016). Em 2017 e 2018 houve uma diminuição dos casos prováveis, caindo para 17.593 e 7.544, respectivamente, sendo as regiões Centro-Oeste e Norte com as maiores taxas de incidência (BRASIL, 2018b).

Uma das primeiras manifestações de má formação congênita descritas na infecção pelo ZIKV foi a microcefalia. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) foi notificado sobre 18.282 casos suspeitos de alterações no desenvolvimento e crescimento relacionado ao vírus Zika, foram notificados seguindo o protocolo de vigilância do Ministério da Saúde sobre microcefalia em recém-nascido, criança, natimorto, abortamento ou feto, até 10 de outubro de 2019. Destes, apenas 2.969 casos foram confirmados (BRASIL, 2019).

Do Brasil, o ZIKV se espalhou rapidamente por toda a América (BAUD et al., 2017). A Colômbia, em outubro de 2015, relatou a transmissão local pelo ZIKV, e em março de 2016 já haviam 51.473 casos suspeitos de infecção (CAMACHO et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015, 2016b). A transmissão para grande parte da América Central e do Sul, além do Caribe, e a possibilidade de a microcefalia estar ligada ao ZIKV levou a

Organização Mundial da Saúde a declarar uma emergência de saúde pública internacional (**Ilustração 1**) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016a, 2016c). No final de 2016, 48 países e territórios das Américas relataram a transmissão autóctone por mosquitos (BAUD et al., 2017; FAUCI; MORENS, 2016; LESSLER et al., 2016; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Além disso, a transmissão via contato sexual foi também relatada na Argentina, Canadá, Chile, Peru e Estados Unidos (MUSSO et al., 2015; HILLS et al., 2016; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Nos EUA e distritos federais foram notificados 4444 casos, incluindo por via sexual, autóctone e vertical, no qual houve relatos de abortos e alterações congênicas em recém-nascidos (FOY et al., 2011; MCCARTHY, 2016; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016, 2018, 2019).

Em 2015-2016, houve um surto em Cabo Verde, sendo considerado o primeiro surto na África (**Ilustração 1**), sugere-se que podem ter sido infectadas entre 221.000 e 329.000 pessoas ZIKV, e 18 casos de microcefalia foram notificados (LOURENÇO et al., 2018). A partir de uma análise inicial, especula-se que o genótipo circulante seja o asiático, que circula nas Américas (LOURENÇO et al., 2018). Em 2016, houve o primeiro surto asiático fora das ilhas oceânicas, em Singapura (**Ilustração 1**), no qual houve a confirmação de 455 casos e o sequenciamento do vírus sugeriu que o surto não estava ligado ao vírus do Brasil nem da Polinésia Francesa, a partir desses dados, acredita-se em uma outra rota do vírus (THE SINGAPORE ZIKA STUDY GROUP, 2017).

Portanto, o ZIKV provavelmente se movimentou para a Ásia na década de 1940 e depois se espalhou por toda a região, formando a linhagem asiática (FAYE et al., 2014). Análises filogenéticas realizadas em genomas completos e parciais do ZIKV demonstram que as cepas podem ser agrupadas em duas principais linhagens genéticas, a africana e a asiática (YUN et al., 2016).

2.2 Ecologia e transmissão

Os principais hospedeiros do vírus são os macacos e humanos (HAYES, 2009; MARCHETTE et al., 1969), já foi detectado anticorpos contra Zika em diferentes espécies de macacos na África e Ásia, mas mesmo assim a soroprevalência de ZIKV continua maior nos humanos (KILBOURN et al., 2003; WOLFE et al., 2001). Além disso, houve a detecção de anticorpos em outras espécies, como os morcegos (ANDRAL et al., 1968), caprinos, roedores

e ovinos (DARWISH et al., 1983), no entanto, nunca foi isolado o vírus nesses animais, portanto não está claro se podem atuar como hospedeiros reservatórios (HAYES, 2009). Acredita-se que na África, o vírus seja mantido pelo ciclo silvestre envolvendo primatas não-humanos e mosquitos, e na Ásia, como na polinésia francesa e micronésia, o vírus se mantém em um ciclo humano-mosquito-humano (HADDOW et al., 2012).

A transmissão vetorial inclui diferentes espécies de mosquitos, principalmente do gênero *Aedes*, como o *A. aegypti*, *A. africanus*, *A. albopictus*, que são amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BERTHET et al., 2014; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; GRARD et al., 2014). Curiosamente, novos surtos podem demonstrar que o ZIKV pode ser transmitido por diferentes vetores, como os gêneros *Culex* e *Anopheles* (DODSON; RASGON, 2017; DUFFY et al., 2009; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2018; GUO et al., 2016).

O contágio independente de vetores pode ocorrer através da transmissão sexual, transplacentária, transfusões de sangue ou amamentação (BESNARD et al., 2014; DRIGGERS et al., 2016; DUPONT-ROUZEYROL et al., 2016; HILLS et al., 2016; VENTURI et al., 2016). A transmissão direta, embora incomum, pode ocorrer através da pele ou membranas mucosas (SWAMINATHAN et al., 2016).

2.3 Manifestações clínicas

Em infecções por ZIKV apenas 20 a 25% dos indivíduos são sintomáticos, desenvolvendo uma doença leve e autolimitada, com período de incubação de 4 a 10 dias (CERBINO-NETO et al., 2016; LAZEAR; DIAMOND, 2016). O quadro clínico clássico da infecção se assemelha ao da dengue e da febre pelo chikungunya, que inclui febre transitória de baixo grau, dor de cabeça, mal-estar, erupção maculopapular, fadiga, mialgia, artrite, conjuntivite e artralgia (BRASIL et al., 2016; CARDOSO et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015;). Os sintomas menos frequentes incluem dor retro orbitária, edema e vômitos (BRASIL et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2014; ZAMMARCHI et al., 2015a;). Outras manifestações clínicas observadas na infecção aguda por ZIKV incluem hematospermia (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015), dificuldades auditivas (TAPPE et al., 2015), trombocitopenia e sangramento subcutâneo (CHRAÏBI et al., 2016; SHARP et al., 2016). Os sintomas normalmente surgem junto com a viremia e desaparecem espontaneamente dentro de uma semana, mas a artralgia pode persistir por até um mês (FOY et al., 2011).

2.3.1 Síndrome Congênita do Zika

O principal sinal neurológico encontrado em infecções por ZIKV é a microcefalia, que ocorre em bebês nascidos de mães infectadas pelo vírus (ARAGAO et al., 2016; BRASIL et al., 2016; CARVALHO et al., 2016; MARTINES et al., 2016; MICROCEPHALY EPIDEMIC RESEARCH GROUP, 2016). A microcefalia é caracterizada pela circunferência da cabeça menor que dois desvios-padrão da média para a idade gestacional no momento do nascimento e é observada em lactentes cujas mães foram infectadas na gestação (**Ilustração 2**) (ARAGAO et al., 2016; BRASIL et al., 2016). Portanto, uma diferença de significância no tamanho do cérebro é um importante fator de risco para disfunção motora e cognitiva (WATEMBERG et al., 2002).

Ilustração 2 - Figura esquemática de bebê com tamanho cefálico normal e bebê com microcefalia.



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, CDC (2016).

Legenda: A linha tracejada indica o tamanho normal para comparação.

Além disso, são observadas alterações em avaliações auditivas e em exames anatômicos de fundo de olho, sendo o principal sinal detectado cicatriz coriorretiniana na região macular do olho (BRASIL et al., 2016; LINDEN et al., 2016; VENTURA et al., 2017; LINDEN et al., 2017). A maioria dos bebês apresentaram deficiência visual, sugerindo que a deficiência visual provavelmente relaciona-se com os danos extensivos ao sistema nervoso central (SNC) (VENTURA et al., 2017). Os principais achados oculares relacionados ao dano no SNC são paresia do nervo oculomotor, abdução de músculos, hipoplasia do nervo óptico, estrabismo convergente e perda de reflexos fotomotores e consensuais (MELO et al., 2016; VENTURA et al., 2017). Nas alterações encontradas no SNC são observados também ventriculomegalia, calcificações e hipoplasia cerebelar (BRASIL et al., 2016; MELO et al., 2016; OLIVEIRA-SZEJNFELD et al., 2016)

Além das anormalidades cerebrais também foi observada uma ampla gama de malformações congênitas, como contraturas congênitas múltiplas, malformações craniofaciais, craniossinostose (fusão prematura das suturas craniais), acidente vascular cerebral isquêmico no território vascular da artéria cerebral média esquerda (BRASIL et al., 2016; HAZIN et al., 2016; LINDEN et al., 2016; MARTINES et al., 2016). Já nos órgãos sistêmicos, houve ocorrência de hepatite viral e hipoplasia pulmonar (MARTINES et al., 2016; CHIMELLI et al., 2017). A artrogripose, ou contraturas articulares, possuem origem neurogênica, apresentando comprometimento crônico de neurônios motores centrais e periféricos, levando o feto a ter posturas fixas no útero e assim deformidades (LINDEN et al., 2016).

2.3.2 Síndrome de Guillain-Barré

Em adultos, o acometimento neurológico da infecção por ZIKV relatado é principalmente a síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma doença autoimune na qual o sistema imunológico ataca parte do sistema nervoso periférico, causando formigamento, fraqueza muscular, paralisia e até a morte (GOODFELLOW; WILLISON, 2016). Além dos sinais gerais de infecção por Zika, esses pacientes apresentam parestesia nas mãos e nos pés (sensações cutâneas subjetivas), cansaço generalizado, perda de parte da motricidade de um ou mais músculos do membro inferior e superior, visão dupla, dificuldade de deglutição (disfagia), paralisia bilateral do nervo facial, deterioração da extremidade, perda do controle muscular durante movimentos voluntários (ataxia), Perda parcial das funções motoras dos membros (tetraparesia), alteração na capacidade de pronunciar as palavras (disartria), incontinência urinária e fecal, e uma visão passageira transtornada (ROSÁRIO et al., 2016; SOARES et al., 2008). Sugere-se que um fator predisponente para a SGB seria uma infecção simultânea de DENV e ZIKV, por levar a uma estimulação imune arboviral e desencadear um processo imunopatogênico, que ocasiona o aumento dos anticorpos preexistentes fazendo com que haja a elevação da capacidade de invasão pelo ZIKV e agravando o quadro clínico (MALTA et al., 2017; RABONI et al., 2017; ROSÁRIO et al., 2016). Anteriormente, essa complicação neuromuscular já foi associada à infecção por outros arbovírus, como a Dengue (CAROD-ARTAL et al., 2013) e o vírus da Chikungunya (WIELANEK et al., 2007).

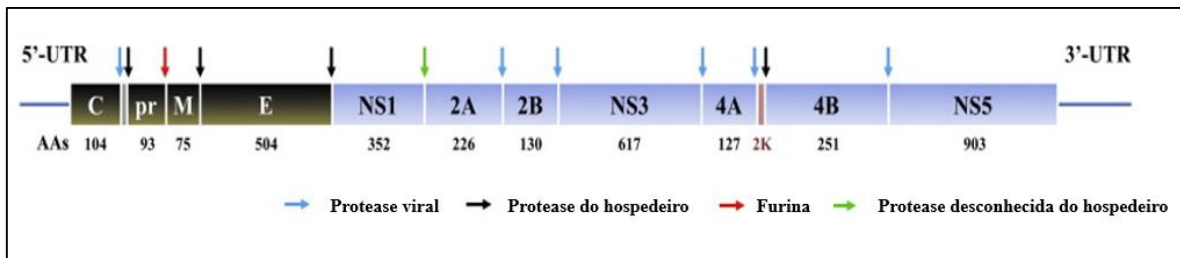
2.3.3 Outras complicações neurológicas

Outras complicações neurológicas relatadas em adultos infectados com ZIKV foram encefalomielite, encefalite e síndrome de polineurite transitória aguda (BARCELLOS et al., 2016; GALLIEZ et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017). Um sinal comum desses casos foi fraqueza nos membros inferiores, provavelmente através de efeito neuropático direto do ZIKV levando a inflamação e inchaço nervoso (NASCIMENTO et al., 2017). Alguns pesquisadores consideram esse sinal um mecanismo que pode levar ao desenvolvimento de SGB. Outros sinais observados foram de paraparesia, parestesias de membros inferiores, retenção urinária, rigidez nucal, hiporreflexia, dor distal, hipoestesia, disartria e confusão mental (GALLIEZ et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017). Portanto, esses sinais fornecem evidências indiretas de invasão viral no SNC com a disfunção da barreira hematoencefálica (plexos coróides) e síntese de anticorpos intratecal, já descrito em outras infecções virais como a dengue (SOARES et al., 2016).

2.4 Estrutura e Genoma viral

O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (THIEL et al., 2005). Os membros desta família possuem semelhanças que incluem a morfologia das partículas virais, estrutura e organização do genoma e os aspectos básicos da expressão gênica e replicação viral (RIDPATH; FLORES, 2007). Eles possuem vírions esféricos (40-60 nm de diâmetro), envelope com duas glicoproteínas virais inseridas e seu genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, ou seja, seu genoma possui a mesma orientação do RNA mensageiro celular e, dessa forma, pode ser interpretado como tal quando presente no citoplasma (HARRIS et al., 2006; RIDPATH; FLORES, 2007; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Dessa forma, a produção das proteínas virais é iniciada assim que o genoma viral é liberado na célula.

Semelhante a outros flavivírus, o genoma do ZIKV tem cerca de 11 kb de comprimento e contém uma única região aberta de leitura (*Open Read Frame - ORF*) flanqueado por regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3' (BARONTI et al., 2014; HEMERT; BERKHOUT, 2016). A ORF codifica uma poliproteína de 3419 aminoácidos que é clivada por ambas as proteases hospedeiras e virais pós-traducionais no capsídeo (C), precursor de membrana (prM), envelope (E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (**Ilustração 3**) (CUNHA et al., 2016; SELISKO et al., 2014). Cada uma dessas proteínas tem múltiplas funções para alterar eventos celulares (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Ilustração 3 - Organização do genoma do ZIKV

Fonte: Adaptado de Ye et al. (2016).

Legenda: As setas azuis, setas pretas e setas vermelhas indicam o local de clivagem da protease viral NS2B / NS3, protease hospedeira e protease de furina, separadamente. A seta verde indica uma protease hospedeira desconhecida.

As proteínas estruturais, juntamente com o RNA genômico, formam partículas virais, enquanto as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação, montagem e evasão do sistema imune do hospedeiro (LINDENBACH; RICE, 2007). A proteína estrutural C do flavivírus se associa ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo, o qual possui um formato icosaedro e funções relacionadas ao processo de montagem do vírus (LIN et al., 2018), além disso possui uma ampla capacidade de ligação a diferentes tipos de nucleotídeos, incluindo DNA de fita única e dsRNAs (SAMUEL et al., 2016).

A proteína precursora da membrana (prM) desempenha um papel importante na formação de vírions maduros por meio da clivagem de prM em proteína M (LIN et al., 2018; PIERSON; DIAMOND, 2012). Além disso, ela protege a proteína E da fusão prematura em condições de baixo pH durante o transporte na rede trans-Golgi, facilitando a maturação do vírion (YU et al., 2008). A proteína E é a principal glicoproteína de superfície do vírion, está envolvida na modulação do ciclo viral através da ligação a célula hospedeira e na fusão da membrana, portanto, é responsável pela entrada do vírus e representa um alvo importante para anticorpos neutralizantes (DAI et al., 2016; FONTES-GARFIAS et al., 2017).

As proteínas não estruturais formam o complexo de replicação e desempenham um papel na resposta da imunidade inata do hospedeiro. A proteína não-estrutural 1 (NS1) é uma proteína não estrutural altamente conservada entre os flavivírus, que existem em diversas formas. A forma de dímero intracelular de NS1 desempenha papel na replicação do genoma (MACKENZIE et al., 1996; WINKLER et al., 1988), enquanto o hexâmero secretado desempenha papel na evasão imune, ativando os receptores Toll-like (TLRs) e inibindo o sistema complemento (XIA et al., 2018; YOUNG et al., 2000).

As proteínas não estruturais NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são integrantes da membrana. A NS2A contém cinco domínios transmembranares e é importante para a replicação e montagem viral (LEUNG et al., 2008; XIE et al., 2013) e a NS2B é um co-fator para a proteína

NS3 (FALGOUT et al., 1991). NS4A e NS4B desempenham múltiplos papéis na replicação viral e interações vírus-hospedeiro, podendo induzir o rearranjo da membrana retículo endoplasmático (ROOSENDAAL et al., 2006), regular a formação de complexos de replicação viral (TEO; CHU, 2014), induzir autofagia na prevenção da morte celular (MCLEAN et al., 2011), regular a atividade ATPase da NS3 (SHIRYAEV et al., 2009; ZOU et al., 2015), interagir com NS1 para modular a replicação viral (LINDENBACH; RICE, 1999), e ainda inibir a sinalização do interferon (AMBROSE; MACKENZIE, 2011; MUÑOZ-JORDAN et al., 2005). No ZIKV, estudos já revelaram a cooperação entre NS4A e NS4B, que ocasiona a supressão da sinalização de Akt-mTOR do hospedeiro, levando assim ao comprometimento da neurogênese em células humanas e à regulação positiva da autofagia, protegendo assim a célula hospedeira da morte, e fornecendo uma célula hospedeira bem protegida para a replicação de vírus em longo prazo (LIANG et al., 2016; MCLEAN et al., 2011).

A protease viral NS2B-NS3 é uma serina protease, formada pela parte N-terminal da NS3 e a região cofator da NS2B, envolvida no dobramento e atividade enzimática (BARONTI et al., 2014; LI et al., 2015). É responsável por clivar as junções de NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5 para liberar proteínas funcionais (CHAMBERS et al., 1990; FALGOUT et al., 1991). Adicionalmente, a protease NS2B/NS3 está implicada na evasão imune através da inibição da produção de interferon do tipo I na infecção por Dengue (AGUIRRE et al., 2012).

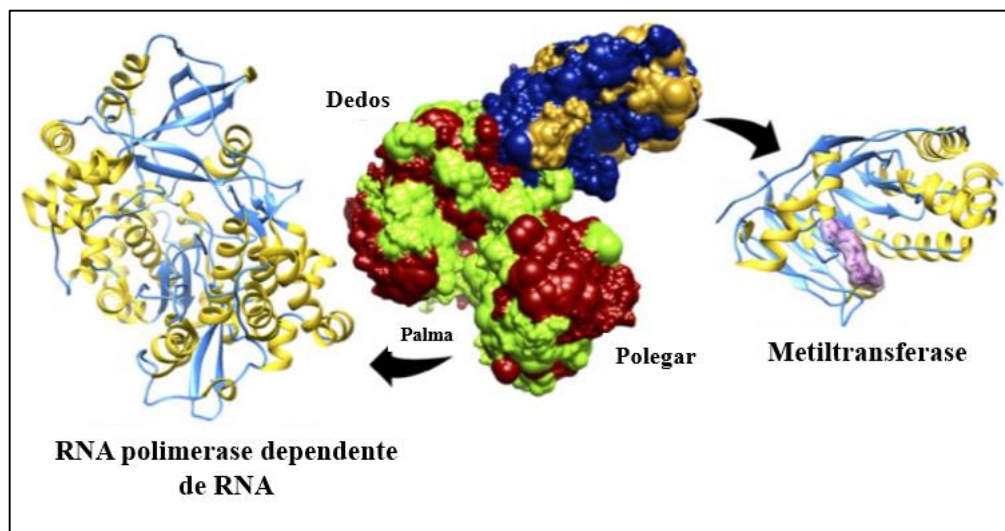
A proteína NS3 é um componente essencial para o processamento de polipeptídios virais e replicação genômica, devido ao seu domínio protease no terminal N e sua atividade de helicase de RNA no terminal C (TIAN et al., 2016). Seu domínio helicase fornece energia química para intermediários da replicação viral, assim facilitando a replicação junto com a RNA polimerase dependente de RNA (NS5) (LINDENBACH; RICE, 2007).

A proteína NS5 é a maior proteína viral cuja porção C terminal tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e o terminal N tem atividade metiltransferase envolvida no processamento do RNA (LINDENBACH; RICE, 2003). Portanto, são cruciais para a estabilidade do genoma, tradução eficiente e evasão da resposta imune do hospedeiro, e responsáveis pela síntese do RNA genômico (SELISKO et al., 2014; ZHAO et al., 2017). Além disso, suprimem a indução e sinalização de interferon do tipo I (GRANT et al., 2016; HERTZOG et al., 2018).

2.5 Proteína não-estrutural 5

Entre as proteínas não estruturais, a NS5 é a maior e mais conservada proteína do complexo de replicação (ZHU et al., 2016). Ela possui duas atividades enzimáticas essenciais, a metiltransferase (MTase) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que são necessárias para a replicação viral (**Ilustração 4**) (DUAN et al., 2017). A região metiltransferase está localizada nas posições N-terminal da proteína NS5, e são cruciais para a estabilidade do genoma, tradução eficiente e evasão da resposta imune do hospedeiro (ZHOU et al., 2007). A região RdRp se encontra na porção C-terminal da proteína, é responsável pela síntese do RNA genômico na ausência de primers, também chamado de mecanismo de iniciação, assim a síntese de RNA de polaridade negativa é realizada a partir do molde de RNA genômico de cadeia positiva, este RNA de cadeia negativa ocasiona a síntese de mais filamentos de RNA de polaridade positiva que irão ser empacotados para formar os vírions (SELISKO et al., 2006, 2014; ZHAO et al., 2017).

Ilustração 4. Estrutura tridimensional da NS5 do ZIKV.

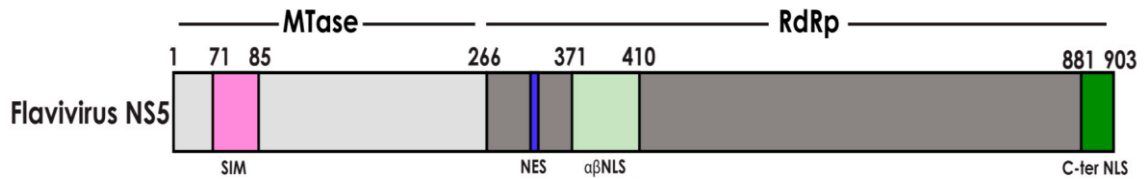


Fonte: Adaptado de Devnarain e Soliman (2018).

Legenda: A proteína estrutural 5 do vírus Zika é dividida em suas duas subunidades principais, a metiltransferase (ligada ao seu substrato natural) e a RNA polimerase dependente de RNA. É descrita como uma mão, com palma, polegar e dedos.

A NS5 também possui uma sequência de localização nuclear funcional (NLS), que interage diretamente com outras proteínas virais e hospedeiras, como a protease-helicase NS3 e a β -importina, que é responsável pelo transporte até o núcleo (TAY et al., 2015; YAP et al., 2007). Além do NLS, a proteína possui uma sequência conservada de exportação nuclear (NES), e um motivo de interação SIM importante para a sumoilação de proteínas que é altamente conservado dentro do seu domínio metiltransferase (MTase) (TAN et al., 2019) (**Ilustração 5**).

Ilustração 5. Sequências envolvidas na regulação da localização subcelular da proteína NS5



Fonte: Adaptado de Tan et al. (2019).

Legenda: O flavivírus NS5 consiste em dois domínios funcionais, a metiltransferase (MTase) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). As regiões envolvidas em sua localização subcelular (SIM, NES, αβNLS e C-ter NLS) também são indicadas.

Além de suas funções na replicação, a NS5 do ZIKV de isolados africanos e polinésios franceses também pode suprimir a sinalização do interferon, através da degradação proteica pelo proteossoma do ativador transcricional STAT2 regulado por IFN em humanos (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Esse mesmo mecanismo foi observado na NS5 do vírus Dengue (ASHOUR et al., 2009; THURMOND et al., 2018). A inibição da produção de IFN na linhagem asiática está provavelmente relacionada a inibição da IRF3 (XIA et al., 2018), no entanto, o mecanismo responsável pela inibição de IFN nas linhagens africanas ainda é desconhecida (LIN et al., 2019).

Além da depleção de STAT2, a NS5 atua no nível do adaptador MAVS ou a downstream na via de sinalização RLR, da imunidade inata, levando a níveis reduzidos de STAT2 e bloqueando a fosforilação de STAT1, dois fatores de transcrição ativados por IFN do tipo 1, e ainda demonstrou-se que a infecção pelo ZIKV gera agonistas de RIG-I e RNAs estimuladores de MDA5 (HERTZOG et al., 2018). Além desse fato, a proteína pode interagir com a família de receptores do tipo NOD, que promove a ativação do inflamassoma e ocasiona a exacerbação da resposta inflamatória e a progressão da doença (WANG et al., 2018). Já no vírus da encefalite japonesa, descobriu-se que a NS5 prejudica a capacidade das células de produzir IFN-β através da inibição da translocação nuclear de IRF3 e NF-κB (YE et al., 2017).

Dessa forma, esses achados indicam que o NS5 do ZIKV desenvolveu várias estratégias para neutralizar a sinalização IFNAR (BEST, 2017; CUMBERWORTH et al., 2017), e que provavelmente é o único antagonista potente do ZIKV dessa sinalização (HERTZOG et al., 2018). Como consequência desse impacto nas vias de sinalização, a expressão de NS4A e NS5 estão estritamente correlacionados a regulação negativa de mRNA e proteína da duplacortina (DCX), que desempenha um importante papel na diferenciação e migração de células progenitoras neurais (JIANG et al., 2018)

A localização nuclear e a compartimentalização da NS5 já foram relatadas, sugere-se que estão localizadas em locais de splicing pois a NS5 já foi colocalizada com a SC35, uma

proteína envolvida no splicing do pré-mRNA, portanto, acredita-se que a NS5 pode desempenhar um papel importante na regulação do processo de processamento do gene nas células hospedeiras (HOU et al., 2017). Fato já relatado na NS5 do DENV, no qual se liga a componentes do spliceossoma e modulam o processamento de genes hospedeiros, como o DDX58 (MAIO et al., 2016). Esse tipo de compartimentalização possui funções em vários processos, como no metabolismo de RNA, na biogênese do ribossomo, na resposta ao dano ao DNA e na transdução de sinal (BANANI et al., 2017).

Acredita-se então, que a localização nuclear seja estritamente necessária para replicação de vírus, por isso é imprescindível elucidar o papel dessa compartimentalização nas funções que a NS5 desempenha.

2.6 Replicação

O ZIKV penetra nas células do hospedeiro via endocitose mediada por receptores. Diferentes receptores podem estar relacionados, como DC-SIGN, Tyro3, TIM-1 e AXL, mas evidências já sugerem que o principal receptor para sua entrada é o receptor Axl da fosfatidilserina encontrado na superfície celular (HAMEL et al., 2015; TABATA et al., 2016).

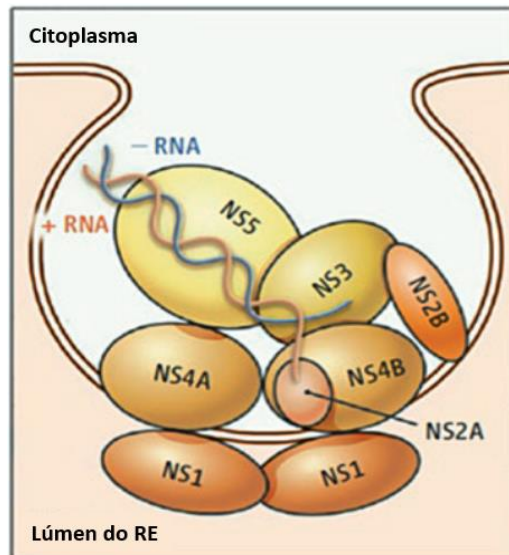
A proteína estrutural E, localizada na superfície viral, medeia a ligação à célula hospedeira, então após a entrada do vírus, o ambiente endossômico ácido desencadeia uma mudança conformacional irreversível na proteína E e induz a fusão da membrana viral com a do hospedeiro (BRESSANELLI et al., 2004). Este evento de fusão permite que o nucleocapsídeo seja liberado do endossomo, e o genoma é rapidamente traduzido na superfície do retículo endoplasmático (SMIT et al., 2011).

A região de codificação do genoma do RNA de fita simples que contém também regiões não traduzidas (UTR) em suas extremidades 5' e 3', é, portanto, traduzida em um polipeptídeo viral e processada em dez proteínas após a maturação por proteases do hospedeiro e também pela protease viral NS2B-NS3 (LUO et al., 2008).

As proteínas não estruturais (NS) virais e fatores do hospedeiro se reúnem para a formação de complexos de replicação (RC) (**Ilustração 6**) através do sequestro de membranas citoplasmáticas do retículo endoplasmático do hospedeiro, esses compartimentos especializados irão coordenar a replicação e a tradução do genoma viral e conferem proteção contra nucleases de células hospedeiras e também a prevenção de sensores de imunidade inata, como membros da família RIG-I e IFIT, que podem detectar moléculas de dsRNA (DECROLY et al., 2012). Portanto, as proteínas NS formam um complexo de replicação que gera RNAs de

sentido negativo que funcionam como moldes para o RNA genômico de sentido positivo (NOVOA et al., 2005; UCHIL; SATCHIDANANDAM, 2003).

Ilustração 6. Representação esquemática do complexo de replicação dos flavivírus.



Fonte: Adaptado de Chatel-Chaix et al (2015).

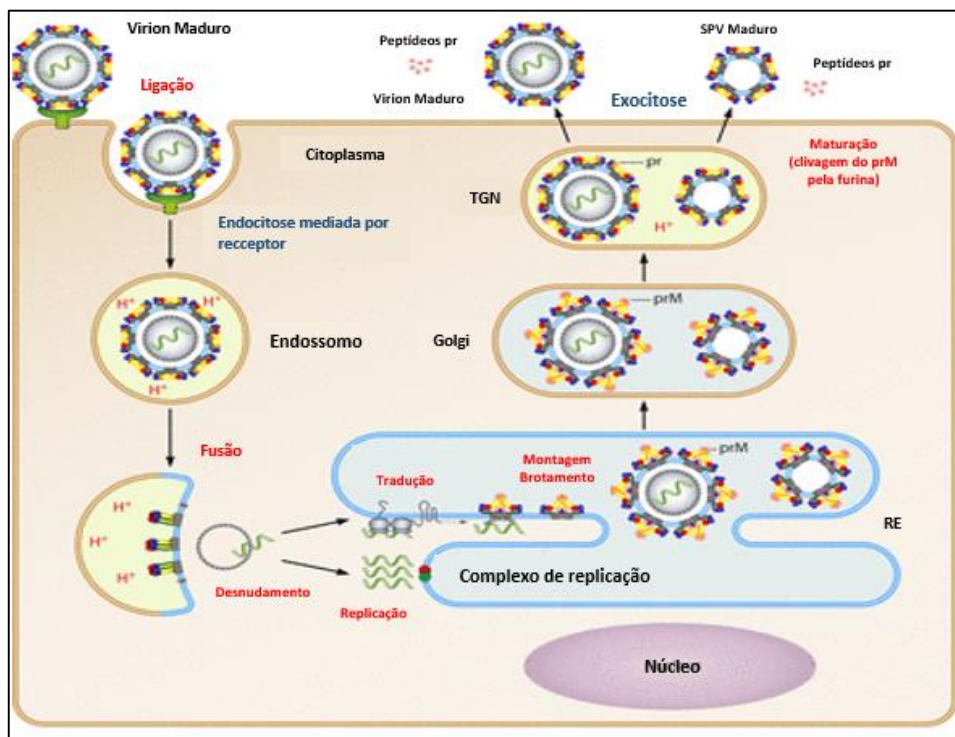
No centro desse complexo encontra-se a NS4B, que liga-se à protease-helicase NS2B-NS3, que por sua vez interage com a polimerase NS5 metil-transferase (LESCAR et al., 2018). A NS2B-NS3 possui um papel central na replicação viral, pois interage tanto com a proteína da membrana NS4B como com a NS5, além de interagir diretamente com o RNA (UMAREDDY et al., 2006), está envolvida no processamento da poliproteína viral e na atividade NTPase (KUO et al., 1996). A NS5 tem atividade de polimerase dependente de RNA (RdRp) (GUYATT et al., 2001) e uma metiltransferase (EGLOFF et al., 2002), esta última implicada no seu papel no encapsulamento do RNA genômico viral.

A proteína NS1 secretada é um fator solúvel de ligação ao complemento, para o qual também foi atribuído um papel na síntese de RNA de fita negativa (LINDENBACH; RICE, 1997). Acredita-se que NS4A, uma proteína de membrana integral, sirva como uma ponte protéica entre o NS1 com o qual interage especificamente (LINDENBACH; RICE, 1997) e o complexo de replicação flaviviral, fixando assim o RC à membrana (MILLER et al., 2007; ROOSENDAAL et al., 2006) Acredita-se que a proteína hidrofóbicas NS2A pode ancorar as proteínas replicativas virais às membranas celulares (CHAMBERS et al., 1989), contribuir para a montagem dos vírions (KÜMMERER; RICE, 2002) e para a inibição da resposta IFN α/β (MUÑOZ-JORDAN et al., 2003).

O processo de maturação passa pela via secretora hospedeira (**Ilustração 7**) (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001), no retículo endoplasmático das células, a progênie recém-formada forma vírions imaturos, exibindo na sua superfície protrusões de heterodímeros da proteína E e da proteína precursora da membrana (prM) (PLEVKKA et al., 2011). Na rede Trans-Golgi, passa por modificações pós-traducionais que incluem a reorganização dos heterodímeros E-prM em homodímeros através do baixo pH da rede trans-Golgi, esse rearranjo ocasiona a exposição do local de clivagem de prM, que é clivado pela protease hospedeira, furina (YU et al., 2008).

O RNA viral recém-sintetizado é então empacotado, e o vírion imaturo é transportado através da via secretora do hospedeiro, onde é posteriormente processado pelas proteases do hospedeiro para gerar um vírion maduro que é liberado da célula infectada por exocitose (**Ilustração 7**) (PIERSON; DIAMOND, 2012).

Ilustração 7. Ciclo de vida do flavivírus e mecanismo de fusão.



Fonte: Adaptado de Heinz e Stiasny (2017).

Legenda: O vírus entra nas células por endocitose mediada por receptor e funde sua membrana por um mecanismo acionado por pH ácido no endossomo para liberar o RNA viral. O RNA genômico de cadeia positiva serve como o único mRNA viral e leva à síntese de uma poliproteína que é processada em três proteínas estruturais e sete não estruturais. A montagem do vírus ocorre na membrana do RE e leva à formação de vírions imaturos, que são posteriormente transportados pela via exocítica. O pH ácido no Trans-Golgi (TGN) provoca alterações estruturais que permitem a clivagem de prM pela protease celular furina e levam ao rearranjo em forma da proteína E. Em pH ácido, a parte pr clivada permanece associada às partículas (impedindo a fusão prematura no TGN) e cai no pH neutro do ambiente extracelular. As partículas subvirais (SVPs) são formadas como um subproduto da montagem do vírion e contém uma membrana lipídica e complexos prM-E.

Como visto, a replicação ocorre normalmente no citoplasma, no entanto, estudos já sugeriram que o RNA viral dos vírus JEV e WNV, se encontram também na fração nuclear de células infectadas (GRUN; BRINTON, 1988; TAKEDA et al., 1978; ZEBOVITZ et al., 1974). Muitos vírus de RNA de fita positiva e negativa que usam o citoplasma do hospedeiro como o local primário de replicação envolvem o núcleo ou seus componentes, sequestrando fatores nucleares e alterando o tráfego citoplasmático nuclear para promover a replicação viral (HISCOX, 2003). Os flavivírus têm demonstrado envolver os núcleos do hospedeiro em sua replicação, embora indiretamente. Portanto, é provável que o núcleo das células infectadas possa funcionar como um local adicional para a síntese de RNA flaviviral (UCHIL et al., 2006).

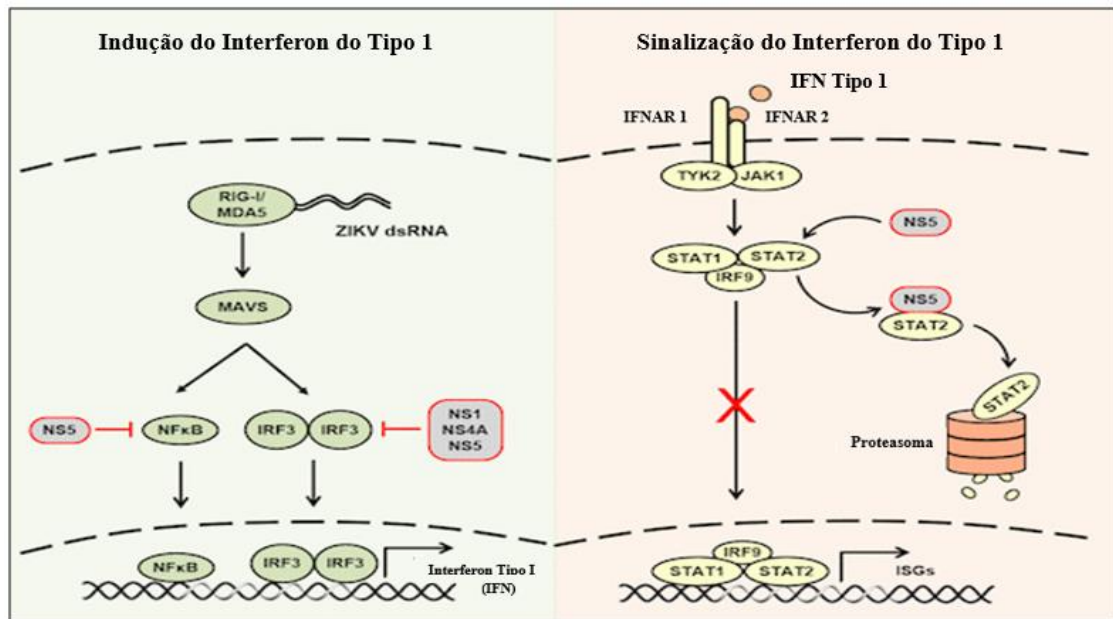
2.7 Resposta Imune Frente à Infecção por Zika

As proteínas virais do Zika estão envolvidas também na atenuação das respostas antivirais do hospedeiro (SUTHAR et al., 2013), a proteína do envelope, por exemplo, participa da ligação, entrada e fusão celular e conseqüentemente é o principal alvo de anticorpos neutralizantes (DAI et al., 2016; MUKHOPADHYAY et al., 2005). No hospedeiro há uma rede de defesa integrada, que inclui as respostas imunes inatas e adaptativas, que tentam impedir o desenvolvimento de infecções virais (BARBER, 2001). Após a entrada do vírus na célula, eles são detectados através de diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que inclui os receptores Toll-like (TLRs) e os receptores do tipo RIG-I (RLRs) (THOMPSON et al., 2011). Esses RLRs, que incluem RIG-I, MDA5 e LGP2, são uma família de sensores inatos de RNA viral que residem no citoplasma de quase todas as células do hospedeiro (LOO; GALE, 2011). As principais defesas celulares que podem suprimir a replicação viral e salvar a célula infectada ocorrem através das vias de sinalização do interferon (IFN), da resposta à proteínas não dobradas (UPR), do mecanismo de reparo do DNA, autofagia e apoptose (DANG et al., 2016; HAMEL et al., 2015; LIANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Durante a infecção por flavivírus, RIG-I e o MDA5 sinalizam através da proteína antiviral mitocondrial (MAVS), atuando assim em conjunto para restringir a replicação dos flavivírus, desencadeando a produção de interferon do tipo 1, genes efetores antivirais e citocinas pró-inflamatórias (ERRETT et al., 2013; LAZEAR et al., 2011; PINTO et al., 2014). A produção de interferon ocorre após a ativação de fatores de transcrição como o fator regulador de interferon 3 (IRF3) e NF- κ B (**Ilustração 8**). Na fase de sinalização (efetora), o IFN-1 secretado se liga a receptores IFNAR, iniciando assim a cascata de sinalização que resulta na transcrição de genes estimulados por IFN-1 (ISGs) (**Ilustração 8**), que codificam proteínas que

inibem a replicação e disseminação do vírus (YE et al., 2013). O vírus Zika bloqueia as vias de indução e sinalização do interferon do tipo I através da regulação negativa da sinalização mediada por IRF3 e NF- κ B, além da degradação proteossomal do STAT2 (**Ilustração 8**) (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016).

Ilustração 8. Representação esquemática das vias de indução e sinalização do Interferon do tipo I.



Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2016).

As proteínas virais NS1, NS4A, NS4B e NS5 foram identificadas como supressores chave da indução do IFN do tipo I (KUMAR et al., 2016; OJHA et al., 2018). As proteínas virais NS1 e NS4B inibem a ativação de IFN- β induzida por RLR ao nível de Quinase 1 de ligação a TANK (TBK1), uma proteína multifuncional implicada não apenas na imunidade inata, mas também em apoptose e proliferação celular. Infecções por ZIKV interrompem a realocação de TBK1 do centrossomo para a mitocôndria, prejudicando assim a mitose e a divisão celular (ONORATI et al., 2016), portanto sugere-se que a TBK1 é um dos principais alvos da infecção pelo ZIKV (WINKLER et al., 2017). Já a NS2B com a NS3 promove a degradação da Janus quinase (JAK1) e a inibição da sinalização JAK-STAT, seguida pela inibição da apoptose induzida por vírus e pelo aumento da replicação viral (WU et al., 2017). A NS5 interage diretamente com o STAT2, através do domínio metiltransferase (MTase), induzindo sua degradação (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Isso pode afetar a atividade de STAT1 alterando o equilíbrio intracelular entre os complexos STAT1-STAT2-IRF9 e STAT1-STAT1 (CHAUDHARY et al., 2017). Esses achados sugerem que as proteínas

não estruturais agem sinergicamente para empregar mecanismos que bloqueiam as respostas antivirais do hospedeiro e facilitam a replicação viral (WU et al., 2017).

A resposta imune celular à infecção por flavivírus, principalmente os neuroinvasivos, é mediada por células T, sendo estes essenciais para a proteção contra doenças e para a eliminação do vírus do sistema nervoso central (LARENA et al., 2011; YAUCH et al., 2009). A presença do ZIKV já foi comprovada em tecidos cerebrais fetais e no líquido cefalorraquidiano tanto em humanos como em modelos animais (CUGOLA et al., 2016; MÉCHARLES et al., 2016; RIVINO; LIM, 2017), sendo assim, as células T CD8⁺ podem possuir um papel fundamental na eliminação do ZIKV do SNC, na prevenção e atenuação das complicações neurológicas (LIMA et al., 2017).

Na fase aguda das infecções por ZIKV, as células T CD8⁺ específicas expandem-se, são polifuncionais e exibem citotoxicidade *in vivo* (ELONG NGONO et al., 2017). Em modelos murinos, a depleção dessas células comprometeu a eliminação de vírus periféricos e do sistema nervoso central durante a infecção pelo ZIKV (LAZEAR et al., 2016; MANANGEESWARAN et al., 2016). Os animais deficientes em CD8 ou MHC de classe I têm uma capacidade reduzida de depuração viral, e as células transferidas de animais selvagens podem ser protetoras (WEN et al., 2017). Curiosamente, a ativação das células T CD8⁺ após a infecção pelo ZIKV foi encontrada diminuída em camundongos prenhes, o que pode sugerir que há disseminação viral para o feto (WINKLER et al., 2017).

As células T CD4⁺, embora de menor frequência que as células T CD8⁺ durante a infecção por flavivírus, contribuem para a proteção através da capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias e apoiar a maturação da resposta de anticorpos (SITATI; DIAMOND, 2006). Elas já foram detectadas em indivíduos imunes ao ZIKV, sendo reativas às proteínas NS1 e Envelope, e pouca capacidade de reação cruzada com DENV (STETTLER et al., 2016). Além disso, já foram detectadas em primatas não humanos infectados com ZIKV (DUDLEY et al., 2016; OSUNA et al., 2016), e caracterizadas em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, no qual apresentou um perfil típico de citocinas Th1, com um alto grau de polifuncionalidade em que a maioria das células produziu IFN- γ , TNF- α e IL-2 (PARDY et al., 2017).

2.8 Patogênese

Os mecanismos patogênicos que levam a microcefalia e outras malformações congênitas ainda não foram totalmente elucidados (BHATNAGAR et al., 2017). Mas relatos já demonstram que está intimamente ligada a importantes vias celulares do hospedeiro, como as

vias receptor Toll-like (TLR), autofagia, apoptose e resposta à proteínas não dobradas (UPR), ocasionando destruição celular e manifestações clínicas (DANG et al., 2016; HO et al., 2017; LIANG et al., 2016; OJHA et al., 2018). Além disso, o ZIKV é capaz de bloquear a sinalização do receptor de IFN (tipo 1) para superar as respostas imunes inatas do hospedeiro (GRANT et al., 2016).

O tropismo celular e tecidual do ZIKV ainda é desconhecido, mas sabe-se que os queratinócitos e as células dendríticas da pele provavelmente representam alvos iniciais da infecção, semelhante ao observado para outros flavivírus (HAMEL et al., 2015; LIM et al., 2011; SURASOMBATPATTANA et al., 2011), além de poder infectar explantes de pele humana e células mononucleares do sangue periférico em cultura (HAMEL et al., 2015). Demonstrou-se também que há indução da autofagia através do acúmulo de vesículas autofágicas nos fibroblastos infectados (HAMEL et al., 2015). Em células-tronco neurais fetais humanas, o ZIKV inibe a sinalização de Akt-mTOR para induzir autofagia, aumentando assim a sua replicação e carga viral (LIANG et al., 2016), consequentemente impedindo a neurogênese. Além disso, o vírus Zika compromete a neurogênese através da desregulação transcricional de 41 genes relacionados ao neurodesenvolvimento, através da hiperativação do receptor Toll like 3 (TLR3) (DANG et al., 2016).

A indução da apoptose é observada em células infectadas pelo ZIKV através da presença de caspase-3, que pode ser induzida a partir de fatores pró-apoptóticos em células infectadas (OLMO et al., 2017). Ghouzzi e colaboradores relataram que a proteína supressora de tumor p53 também está implicada na apoptose mediada pelo ZIKV, já que a inibição da p53 por inibidores farmacológicos ou através da fosforilação do Ser15, limita a apoptose induzida por ZIKV em progenitores neurais (GHOZZI et al., 2016). A p53 também está correlacionada com a ativação da transcrição de vários genes pró-apoptóticos, incluindo Bax, Noxa e Puma, enquanto suprime genes antiapoptóticos, como a survivina, resultando na ativação da via de apoptose (AMARAL et al., 2010).

Foi relatado que o ZIKV induz a via de sinalização intracelular chamada resposta à proteínas não dobradas (*Unfolded Protein Response – UPR*) no córtex cerebral fetal humano, cérebro embrionário de camundongo e células-tronco neurais humanas in vitro (GLADWYNNING et al., 2018). Essa via é ativada para aliviar o estresse do retículo endoplasmático, que sofre rearranjos pela formação dos complexos de replicação (GILLESPIE et al., 2010). Se o estresse não está sob controle a UPR induz a degradação autofágica seletiva do retículo (Fagia-ER) ou apoptose (HETZ, 2012). Existem três proteínas residentes no retículo endoplasmático que são os principais pontos de regulação da ativação da via UPR, que são a quinase e endonuclease

IRE1, a quinase PERK e o fator de transcrição com zíper de leucina ATF6 (SCHRÖDER, 2008). Já foi demonstrado que defeitos neurogênicos associados ao ZIKV foram diminuídos pela inibição da PERK, e que a inibição da IRE-1 α reduziu a replicação em células corticais (GLADWYN-NG et al., 2018).

Estudos de infecção *in vitro* de células placentárias humanas mostraram que o ZIKV se replica nas células de Hofbauer, trofoblastos e células endoteliais fetais, e que assim induzem a expressão de genes antivirais (QUICKE et al., 2016; TABATA et al., 2016). Em experimentos *in vivo* foi observado que o ZIKV infectou diferentes trofoblastos, como os espongiotrofoblastos, trofoblastos mononucleares e sincitiotrofoblasto (MINER et al., 2016a). Em humanos e camundongos, o ZIKV mostrou-se ser capaz de infectar não apenas feto e placenta, mas também os olhos, com detecção de RNA viral em lágrimas e córnea (MINER et al., 2016b; SUN et al., 2016), o trato reprodutivo masculino, estando associado a dano tecidual testicular, oligospermia e detecção de RNA viral no sêmen (MA et al., 2016; MANSUY et al., 2016; NICASTRI et al., 2016); e trato reprodutivo feminino, com relatos de detecção do RNA em muco cervical humano (MURRAY et al., 2017; PRISANT et al., 2016). Em cérebros de crianças com microcefalia que morreram e em placentas de mulheres que sofreram aborto espontâneo foi detectado o RNA viral (BHATNAGAR et al., 2017). Em primatas não-humanos o RNA foi identificado em tecidos fetais e maternos, com maior carga observado na placenta (ADAMS WALDORF et al., 2016).

Já se demonstrou que o ZIKV também é capaz de infectar neurônios maduros, mas infecta preferencialmente células progenitoras neurais humanas (hNPCs), podendo desencadear a apoptose (ONORATI et al., 2016; TANG et al., 2016), e consequentemente alterações no desenvolvimento do córtex cerebral fetal, sendo um mecanismo potencial para microcefalia. Em organoides cerebrais humanos, a infecção levou a uma redução nas zonas proliferativas e camadas corticais, causando uma diminuição no tamanho do organoide (DANG et al., 2016). Em camundongos, o vírus infecta diferentes linhagens neuronais e causa parada do ciclo celular, apoptose e inibição da diferenciação de células progenitoras neurais, afetando assim o desenvolvimento córtex cerebral dos embriões (CUGOLA et al., 2016; LI, C. et al., 2016; WU et al., 2016). Além disso, a diferenciação e migração de neurônios em cérebros em desenvolvimento podem ser alterados (BAYLESS et al., 2016; JIANG et al., 2018).

Em camundongos adultos imunocompetentes (Ifnar1 $-/-$) foi observado acúmulo do vírus no sangue, baço, cérebro, medula espinhal, rim e olho, após utilização de isolados clínicos (LAZEAR et al., 2016; LI, H. et al., 2016; MA et al., 2016; MINER et al., 2016b). Também foi observado características próximas a doença humana, como infecção placentária e transmissão

transplacentária, doença neuroinvasiva e paralisia de membro. A infecção por via congênita através da via subcutâneo ou intravaginal nesses camundongos apresentou anormalidades, como restrição de crescimento intra-uterino e morte fetal (MINER et al., 2016a; YOCKEY et al., 2016).

Em macacos rhesus, achados apontam que a replicação precoce do ZIKV é parcialmente restrita por respostas precoces de interferon, que é então controlada no sangue periférico por anticorpos neutralizantes específicos do vírus entre os dias 6 e 10 de infecção (AID et al., 2017). Nos seres humanos, o ZIKV antagoniza a resposta do interferon do tipo 1 (IFN), através em parte da proteína NS5, que promove a degradação proteossomal do STAT2 (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). No entanto, no sistema nervoso central, nódulos linfáticos e tecidos gastrointestinais, o vírus pode persistir por um período de tempo mais longo, possivelmente como resultado da ativação do mTOR, das vias pró-inflamatórias e anti-apoptóticas que promovem a sobrevivência de células infectadas, além da exclusão de anticorpos específicos do vírus no LCR (AID et al., 2017).

3 JUSTIFICATIVA

O aumento dos casos de infecção pelo vírus Zika representa um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo e possuem um alto potencial epidêmico, ocorrendo por diversos fatores, desde a distribuição geográfica dos vetores, a variedade de sinais clínicos inespecíficos, e principalmente, a pouca ou total falta de apoio laboratorial e medidas imunoproláticas.

A proteína NS5 dos flavivírus utilizam de estratégias para atingir as vias de sinalização do hospedeiro e podem modular a respostas imune do hospedeiro, além disso, trabalhos já demonstraram sua translocação para o núcleo. A sua localização nuclear pode interferir na maquinaria de transcrição e modular o mecanismo de splicing.

Dessa maneira, dados que contribuam para uma melhor compreensão da distribuição intracelular bem como da interação das proteínas virais em células hospedeiras, poderiam levar a estudos que levem a novas terapias confiáveis destinadas a atenuar a infecção. Dado o impacto substancial da infecção por ZIKV, há uma necessidade urgente de estudos que busquem compreender a interação entre o vírus e o hospedeiro.

4 OBJETIVOS

Este tópico apresenta o objetivo geral e objetivos específicos.

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre a compartimentalização da proteína NS5 do vírus Zika e sua interação com proteínas das células hospedeiras.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Investigar a compartimentalização da proteína viral em células transfectadas expressando a NS5;
- b) Identificar potenciais proteínas do hospedeiro que possam interagir com a região NS5 do ZIKV;

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Este tópico apresenta os procedimentos metodológicos realizados no decorrer do trabalho: local do experimento, linhagens celulares, vírus Zika, plasmídeos contendo o gene NS5 do vírus Zika, clonagem, infecção, transfecção, fluorescência, investigação da expressão da proteína NS5 por *western blot*, imunoprecipitação e espectrometria de massas e aspectos éticos.

5.1 Local do Experimento

O Instituto Aggeu Magalhães (IAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – Pernambuco) contém laboratórios de pesquisa e inovação que possuem toda 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) também 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

Este tópico apresenta linhagens celulares utilizadas no decorrer do trabalho: células VERO e células HEK293T.

5.2.1 Células VERO (ATCC® CCL81™)

As células VERO correspondem a 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 3×10^6 células por garrafa em meio MEM (Gibco™) suplementado com 10% de SFB e solução de antibiótico PEN/STREP (1%). Depois disso as células foram mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

5.2.2 Células HEK293T (ATCC® CRL-3216™)

As células HEK293T correspondem a linhagem derivadas de células de rim embrionário humano, diferentemente da HEK293, expressam constitutivamente o antígeno T do SV40 (simian vírus 40), que permite a replicação de vetores contendo a origem de replicação SV40 nas células de mamíferos. Foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA) e cultivadas em garrafas T-75 a 3×10^6 células por garrafa em meio DMEM (Gibco™) suplementado com 10% de SFB e solução de antibiótico PEN/STREP (1%). Depois disso as células foram mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

5.3 Vírus Zika

Este tópico apresenta procedimentos utilizados com o vírus Zika no decorrer do trabalho, como identificação do vírus, produção do estoque e titulação.

5.3.1 Identificação da amostra viral

A cepa brasileira, denominada *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. O isolamento do vírus ocorreu no LaViTE e foi doado pela Dra. Marli Tenório, pesquisadora sênior do mesmo (DONALD et al., 2016).

5.3.2 Produção do Estoque Viral

Uma amostra do vírus foi inoculada em células VERO (ATCC) e incubada em estufa a 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 a 400RCF por 10 minutos em temperatura de refrigeração (4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante, o qual contém as partículas virais, foi aliquoteado 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 (1×10^5 células/ poço) foram infectadas com diluições seriadas dos estoques de vírus Zika coletados anteriormente. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o inoculo 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 (PFU/ml).

5.4 Plasmídeos contendo o gene NS5 do ZIKV

Este tópico apresenta os plasmídeos que contem o gene NS5 do vírus Zika utilizados no decorrer do trabalho: pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 e NS5-eYFP-pCDNA.

5.4.1 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5

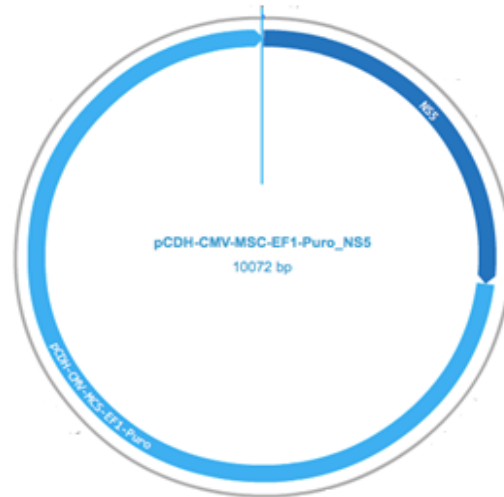
Os plasmídeos contendo o gene NS5 do ZIKV foram gentilmente cedidos pelos Qiming Liang e Jae U. Jung, pesquisadores da Escola de Medicina da Universidade do Sul da Califórnia (LIANG et al., 2016). O gene inserido é da cepa africana MR766. Possui um tamanho total de 10072 bp, e o gene 2714pb (**Ilustração 9**). 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-1 fator de alongação que garante a expressão de puromicina.

5.4.2 NS5-eYP-pCDNA

Os plasmídeos contendo o gene NS5 do ZIKV foram gentilmente cedidos pelos Jan Rehwinkel e Jonny Hertzog, pesquisadores da Universidade de Oxford (HERTZOG et al., 2018). O gene está inserido em plasmídeos pCDNA3.2TM/V-5-DEST, e o gene inserido é da cepa brasileira Natal RGN, possuindo um tamanho total de 9045 bp (**Ilustração 10**). O plasmídeo é composto por regiões CMV é a região promotora de citomegalovírus; a tag V5 C-terminal para fácil detecção; gene de resistência a neomicina para seleção estável; gene de

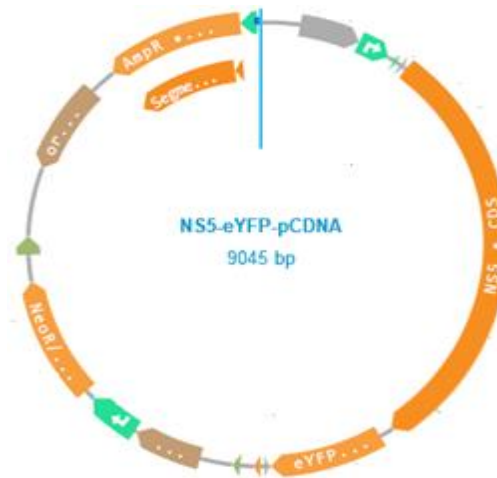
resistência à ampicilina e origem pUC para seleção e manutenção em *E. coli*. Além disso, possui o eYFP, proteína fluorescente amarela.

Ilustração 9. Representação do plasmídeo pCDH-CMV-MSC-EF1-Puro_NS5 contendo o gene da proteína NS5.



Fonte: Adaptado de Liang et al. (2016).

Ilustração 10. Representação do Vetor NS5-eYFP-pCDNA contendo o gene da proteína NS5 e a proteína fluorescente amarela (eYFP).



Fonte: Adaptado de Hertzog et al. (2018).

5.5 Clonagem

Este tópico apresenta procedimentos utilizados com os plasmídeos no decorrer do trabalho, como preparação de células quimiocompetentes, transformação, extração plasmidial, digestão enzimática e sequenciamento.

5.5.1 Preparação de células DH5 α quimicompetentes

Bactérias *E.coli*, cepa DH5 α (utilizadas para clonagem gênica) obtidas comercialmente, foram tornadas quimicamente competentes para a recepção de DNA plasmidial por meio de tratamento à base de cátions bivalentes. Uma colônia foi inoculada em cinco mililitros (mL) de meio Luria Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl), e submetida a crescimento a 37°C, 225 rotações por minutos (rpm), a *overnight*. Após esse período, o pré-inóculo dessa cultura foi transferido para 500 mL de meio LB, e submetidos à agitação de 225rpm, a 37°C, até a cultura atingir uma densidade óptica (OD) entre 0,5 e 0,6 (aproximadamente 2×10^8 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 a 4°C, 5500 rpm, por cinco minutos. As células foram mantidas a 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 a -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 pUC19 (Sigma-Aldrich).

5.5.2 Transformação

Os plasmídeos correspondentes ao segmento o gene da proteína não-estrutural 5 foram introduzidos em células procarióticas (*Escherichia coli*) da cepa DH5 α , para isso, foram adicionados 1,5 μ L do DNA plasmidial em 40 μ L de células competentes, e no controle negativo foi mantido apenas as células competentes. Cada mistura foi submetida a um ciclo térmico de 30 minutos em banho de gelo, 50 segundos a 42°C e 2 min em banho de gelo, então, adicionou-se 250 μ L de meio LB líquido em cada *ependorf*. 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 μ L da solução em meio LB sólido com 100 μ g/mL de ampicilina (para a seleção das colônias), sendo incubadas *overnight* a 37°C para o crescimento bacteriano.

5.5.3 Extração plasmidial

Colônias foram selecionadas e inoculadas em 100 mL de meio LB líquido com 100mg/mL de ampicilina, e incubadas em agitador orbital a 37°C sob agitação de 180rpm (rotações por minuto) a overnight. Após esse período, a cultura bacteriana foi colocada em tubos cônicos de 50mL e centrifugada a 5000g por 10min. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit PureYield™ Plasmid *Midiprep* System (Promega), conforme instruções do fabricante. Após a extração o DNA plasmidial foi quantificado 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

Os ensaios de digestão serão realizados num volume final de 15 µL, contendo no máximo 5µg de DNA. O tampão da reação foi utilizado de acordo com o fabricante; água deionizada e as enzimas de restrição para cada plasmídeo. A reação foi incubada por 8h na temperatura indicada para cada enzima e depois inativadas por 20 minutos a 65°C. A análise foi através da migração por eletroforese.

Nos plasmídeos pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 as enzimas envolvidas na digestão específica na borda do gene de interesse foram *NotI* e *NheI*, e na digestão que clivam parte do vetor e parte do gene foram *SphI* e *XbaI*. Nos plasmídeos NS5-eYFP-pCDNA, foram utilizadas as enzimas *NotI* e *SacI*, e *BamHI* e *SmaI*, respectivamente.

5.5.5 Sequenciamento do Gene

Após a extração do DNA plasmidial, 3 clones de cada vetor foram enviados para o sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), do próprio Instituto Aggeu Magalhães, que utiliza o aparelho *Applied Biosystem 3500xL Genetic analyzer*. As sequências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento dos plasmídeos foram analisadas através o programa *CLC Main Workbench* e comparadas com dados genéticos depositadas no GenBank.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados no plasmídeo pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 são citadas no quadro 1:

Quadro 1. Oligonucleotídeos externos e internos utilizados na amplificação do gene da NS5 do plasmídeo pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5.

<i>Primer</i>	<i>Orientação</i>	<i>Sequência</i>
NS5F	<i>Forward</i>	5'-CACGCTGTTTTGACCTCCATAGA-3'
NS5R	<i>Reverse</i>	5'-TAGGCACCCGTTCAATTGC-3'
NS5int-F	<i>Forward</i>	5'-AATGCAGCACTGGGAGCA-3'
NS5int-R	<i>Reverse</i>	5'-AGGTGGTGTCTCTCTCCCTAT-3'
NS5intF.2	<i>Forward</i>	5'-GAGTTACAGGAATAGCCATGACT-3'
NS5intR.2	<i>Reverse</i>	5'-TTCGACTCCACCTCCTGAGT-3'

Fonte: Autor.

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados no plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA são citadas no quadro 2:

Quadro 2. Oligonucleotídeos externos e internos utilizados na amplificação do gene da NS5 do plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

<i>Primer</i>	<i>Orientação</i>	<i>Sequência</i>
pCDNAF1.1	<i>Forward</i>	5'-CCCAAGCTGGCTAGTTAAGC-3'
pCDNAR1.2	<i>Reverse</i>	5'-GGTCATGGCTATTCCTGTGAC-3'
pCDNAF2.1	<i>Forward</i>	5'-CGGAAACGTGGTTCTTTGAC-3'
pCDNAR2.2	<i>Reverse</i>	5'-CTCTTGTGTGTCCTTCCCTAACT-3'
pCDNAF3.1	<i>Forward</i>	5'-GCAGTCAGTGGAGATGATTGC-3'
pCDNAR3.2	<i>Reverse</i>	5'-CGTCCTCCTTGAAGTCGATG-3'
pCDNAF4	<i>Forward</i>	5'-ATCTTCTTCAAGGACGACGG-3'

Fonte: Autor.

5.6 Infecção

As células HEK293T, na quantidade 4×10^6 células por frasco de cultivo T-75cm² foram infectadas na multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e 5. As células foram infectadas 24h pós repique, ao apresentarem confluência entre 80% a 90%. 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 minuto. Após esse período, o volume das garrafas foi completado para 15mL com meio suplementado com 2% de SFB, 1% de PEN/STREP. As células foram mantidas nas condições de incubação por 48h e 72h pós-infecção, posteriormente foram lisadas e o extrato proteico obtido foi armazenado para análise de western blotting.

5.7 Transfecção

As células HEK293T foram semeadas a uma densidade de 4×10^6 em garrafas de cultura T75. Após 24 h, foram transfectados com 20 μg de DNA plasmídial e 20 μL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em meio Opti-MEM (Gibco), incubados por 24h a 37°C, 5% CO_2 , após esse período houve a troca do meio de cultura para um completo com soro e antibiótico. As células foram mantidas nas condições de incubação por 48h e 72h pós-transfecção, posteriormente foram lisadas e o extrato proteico obtido foi armazenado para análise de western blotting. Foi usada uma concentração de DNA recomendada pelo fabricante para os ensaios de transfecção e padronizada pela equipe.

5.8 Fluorescência

Com o objetivo de analisar a compartimentalização e expressão da NS5 foi observado a expressão do plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA através da visualização da proteína fluorescente amarela (YFP) fusionada a NS5, que foram visualizados utilizando microscópio de epifluorescência e confocal. Para tal, $1,5 \times 10^5$ células HEK293T foram 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 transfectadas com os plasmídeos, e mantidas em estufa por 48h, após esse período os sobrenadantes foram desprezados e os tapetes celulares fixados com 500 μL de paraformaldeído (PFA) a 4,0% (*Electron Microscopy Sciences*) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após fixação as células foram lavadas com PBS (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 μL de gelatina porcina 0,2% (*Sigma-Aldrich*®) por 20 minutos a 37°C. Após incubação, mais uma etapa de lavagem com PBS foi realizada e então as lâminas foram montadas com ProLong Diamond Antifade Mountant com Dapi (Invitrogen™), este utilizado para corar o núcleo das células. As lâminas foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Leica DMI 4000 B e confocal, e posteriormente analisadas com auxílio do software *Fiji Image J*.

5.9 Investigação da expressão da proteína NS5 por Western Blot

As células transfectadas e infectadas coletadas anteriormente foram lisadas em tampão de lise RIPA (Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland) contendo inibidores de Proteases e Fosfatases (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA), e incubadas por 30min no gelo. Após a lise as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C para eliminação de material genético precipitado. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford usando reagente comercial, seguindo as instruções do fabricante (Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland).

As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli a fim de se obter a quantidade de 40µg por 20 µL, foram desnaturadas à 95°C durante 5 minutos e aplicadas as canaletas do gel de poliacrilamida. Os lisados foram separados por SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida a 10% (BIO-RAD, Hercules, Califórnia, U.S.A.) e as proteínas transferidas para membranas de PVDF a 15V por 60 minutos em um sistema semi-dry de transferência (Semidry Tranfer Cell, BIORAD). O bloqueio foi realizado por 2 horas em agitação branda com tampão de bloqueio (5% leite desnatado em PBS+ 0,1% Tween 20) a temperatura ambiente. Anticorpos primários anti-NS5 Zika (Genetex, diluição 1:2000) e anti-V5 (Thermo Fisher, diluição 1:5000) foram diluídos em solução 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e incubados a overnight sob agitação branda. A membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos, seguida por 1 hora de incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-Mouse IgG e *Anti-Rabbit* HRP) diluído em tampão de bloqueio. Após uma série de lavagens as membranas foram reveladas no equipamento LAS 500.

5.10 Imunoprecipitação e espectrometria de massas

Após confirmado por Western blot a presença das proteínas nos lisados celulares, as mesmas foram imunoprecipitadas com o anticorpo V5 Tag (Thermo Fisher, R960-25) ou anticorpo anti-NS5 Zika (Genetex) com de 25 µL de esferas magnéticas de proteína G (Invitrogen). Para tal fim, procedeu-se com a incubação de 1000µg do lisado proteico com o anticorpo por overnight a 4°C, no outro dia o complexo NS5-anticorpo foi incubado por 1h a 4°C com as esferas magnéticas de proteína G. Posteriormente, houve a separação magnética e coleta do lisado não ligado, após esse processo foram realizadas 3 lavagens com PBS adicionado de inibidor de protease para remoção das ligações inespecíficas do complexo

precipitado NS5-anticorpo-esferas. As proteínas precipitadas foram eluídas por meio da adição de tampão de amostra para gel SDS-PAGE.

As proteínas imunoprecipitadas (IP) e as proteínas não ligadas foram fracionados em gel SDS-PAGE 10%, e analisadas por Western-blot com anticorpo primários anti-NS5 Zika (Genetex, diluição 1:2000) e anti-V5 (Thermo Fisher, diluição 1:5000), e secundários anti-Mouse IgG (diluição 1:10000) e anti-Rabbit (diluição 1:30000). Após a confirmação da coimunoprecipitação por Western blot as amostras das IPs foram fracionadas em novo gel SDS-PAGE 12%, mas a corrida foi interrompida quando as amostras entraram na malha de poliacrilamida mais concentrada do gel. O gel foi então corado com azul de Comassie Blue 250-R (staining) e depois descorado durante a noite com a solução descorante (metanol, ácido acético e água destilada).

O conjunto de proteínas foi então excisado do gel e enviado em tubos de microcentrífuga com água destilada para a subunidade RPT02H - Espectrometria de Massas - PR no Instituto Carlos Chagas da Rede de Plataformas Tecnológicas/ Fiocruz que realiza a análise proteômica baseada em nano cromatografia líquida acoplada a ionização eletrospray e espectrometria de massas sequencial (nanoLC-ESI-MS/MS), utilizando o espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific).

A seleção dos alvos enriquecidos resultantes do espectrômetro de massas foi calculada por meio do Microsoft excel, através da razão do LFQ de massa da amostra teste (provenientes das imunoprecipitações dos lisados das células transfectadas) pela amostra controle (lisado das células não transfectadas). Então foi organizada uma lista com a razão das proteínas, número de vezes que essa amostra é maior que o controle, do maior para o menor, e foi adotado um score de razão acima de 3. Diante disso, esses dados foram analisados levando em consideração seus processos biológicos, localização e citações da literatura, o banco de dados de proteínas humanas utilizados foi o *UniProt*.

5.11 Aspectos Éticos

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. O presente projeto, de número 06/2018, foi aprovado na Comissão Interna de Biossegurança (CIBio/CPqAM) para projetos que envolvem OGMs.

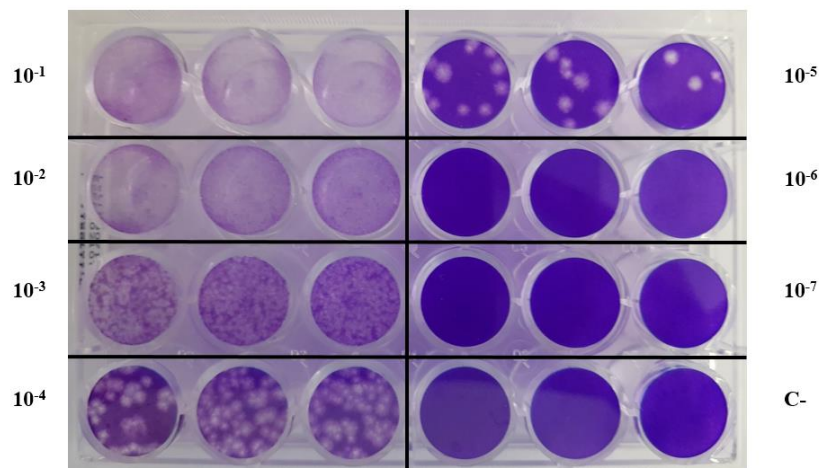
6 RESULTADOS

Este tópico apresenta os resultados obtidos no decorrer do trabalho: titulação do estoque viral, expansão dos plasmídeos, confirmação dos genes por digestão enzimática, sequenciamento dos genes contidos nos vetores, análise da expressão da proteína NS5, fluorescência em células HEK293T, imunoprecipitação dos complexos proteicos e espectrometria de massas.

6.1 Titulação do estoque viral

O estoque de vírus foi realizado com o objetivo de comparação da expressão do NS5 no ensaio de western blot entre os grupos transfectados e infectados. A titulação viral do estoque foi realizada com o ensaio de placa – PFU em placa de 24 poços, no qual placas de lise individualizadas e visíveis foram contadas, como mostra a **Ilustração 11**, alcançando o título $1,2 \times 10^6$ PFU/mL.

Ilustração 11. Perfil da titulação por formação de placa (PFU).



Fonte: Autor.

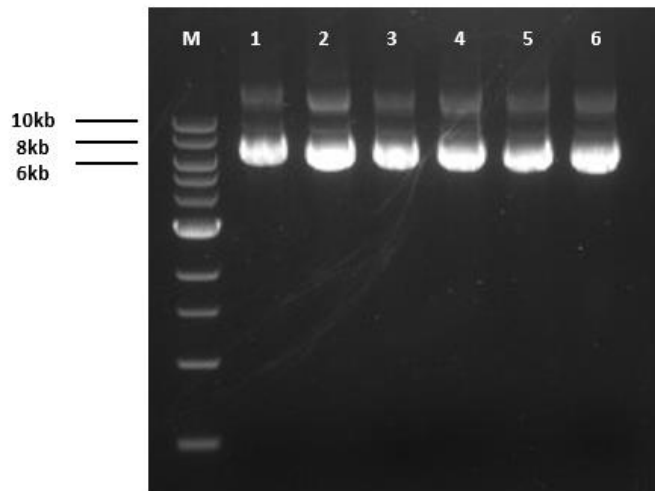
Legenda: A figura ilustra uma placa de 24 poços, no qual os três últimos poços da linha 4 correspondem ao controle negativo. O restante dos poços corresponde as diluições seriadas 1:10. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

6.2 Expansão dos plasmídeos

A qualidade e concentração do DNA plasmidial extraído pelo kit PureYield™ Plasmid Miniprep System da Promega, foi medido através da eletroforese em gel de agarose a 1% e, subsequentemente, analisadas através das leituras em espectrofotômetro.

Ambos plasmídeos foram amplificados como demonstrado pela **Ilustração 12** para o plasmídeo pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5, e **Ilustração 13** para o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

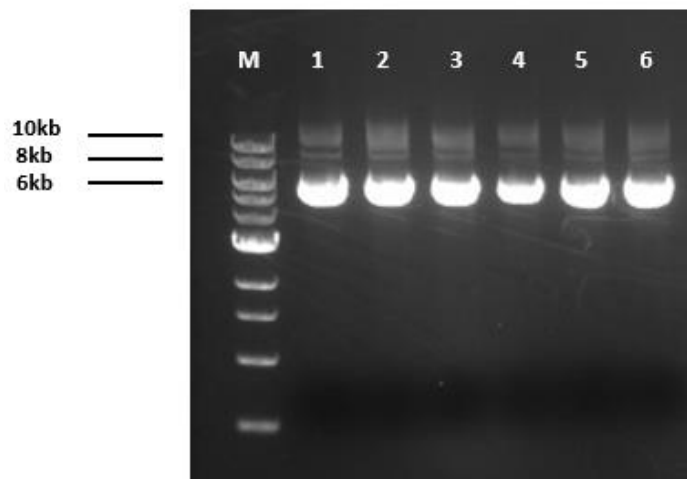
Ilustração 12. Eletroforese dos plasmídeos pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 amplificados.



Fonte: Autor.

Legenda: M) Marcador de tamanho molecular (1kb DNA Ladder NEB); 1), 2), 3), 4), 5) e 6) plasmídeo de interesse aplicado após extração em gel de agarose a 1%.

Ilustração 13. Eletroforese dos plasmídeos NS5-eYFP-pCDNA amplificados.



Fonte: Autor.

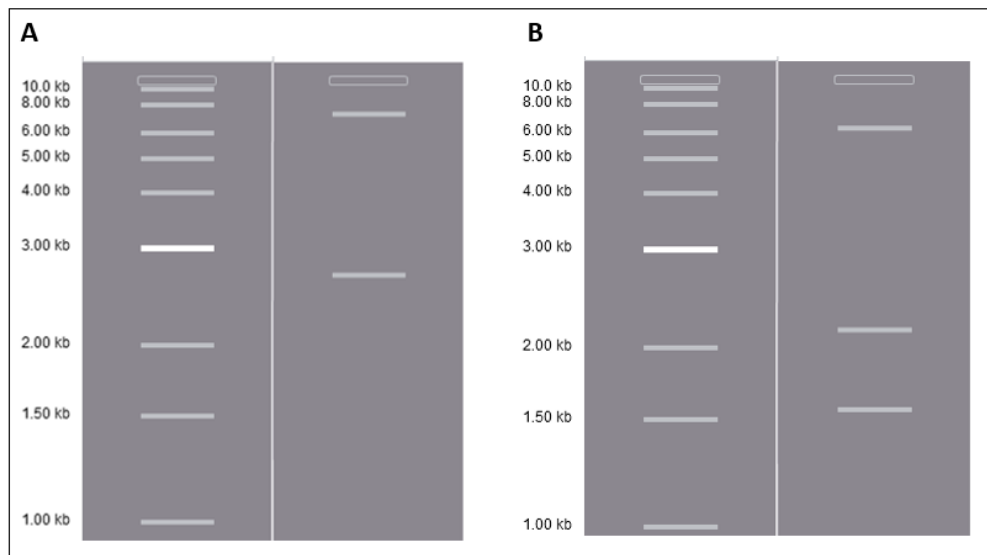
Legenda: M) Marcador de tamanho molecular (1kb DNA Ladder NEB); 1), 2), 3), 4), 5) e 6) plasmídeo de interesse aplicado após extração em gel de agarose a 1%.

6.3 Confirmação dos genes por digestão enzimática

Após transformação por cada vetor contendo o gene NS5, clones foram selecionados para a preparação de DNA plasmidial. O DNA extraído foi enzimaticamente clivado para conferir a identidade dos genes de interesse, foi realizado uma digestão específica nas bordas do gene de interesse e uma digestão que clivam parte do vetor e parte do gene. Posteriormente os produtos das reações da digestão foram migrados em gel 1% agarose.

Nos plasmídeos pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 foi submetido ao tratamento com as enzimas de restrição *NotI* e *NheI* para liberação do gene, e *SphI* e *XbaI* para confirmação do vetor. Na primeira digestão com *NotI* e *NheI* há a formação de duas bandas, uma com 7354pb e outra com 2718pb (**Ilustração 14A**), na segunda digestão com *SphI* e *XbaI* há a formação de três bandas, uma com 6322pb, uma 2182pb e uma com 1568pb (**Ilustração 14B**). Todos os clones obtidos liberaram fragmentos de tamanho esperado, confirmando o sucesso das estratégias de clonagem dos vetores (**Ilustração 15**).

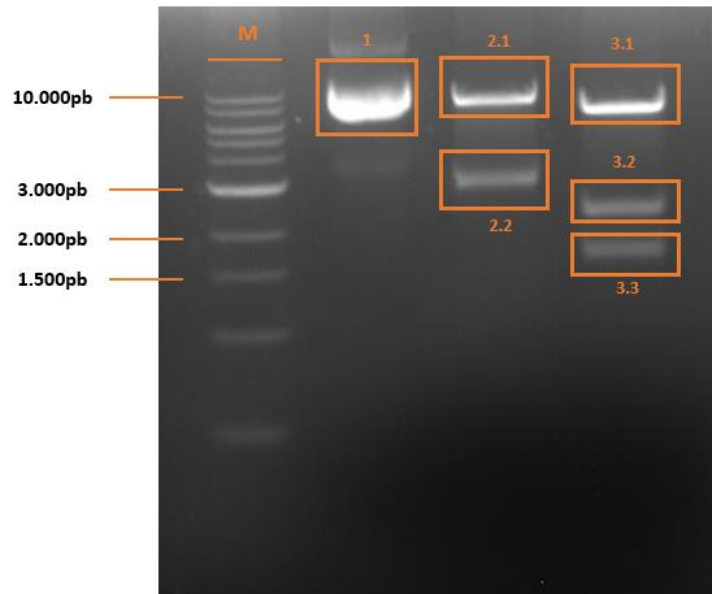
Ilustração 14. Simulação do perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5.



Fonte: Autor.

Legenda: Simulação realizada no *GenomeCompiler* para comparação e confirmação dos tamanhos de bandas obtidas. **A-** Simulação da construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *NotI* e *NheI*; **B-** Simulação da construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *XbaI* e *SphI*.

Ilustração 15. Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 obtida.

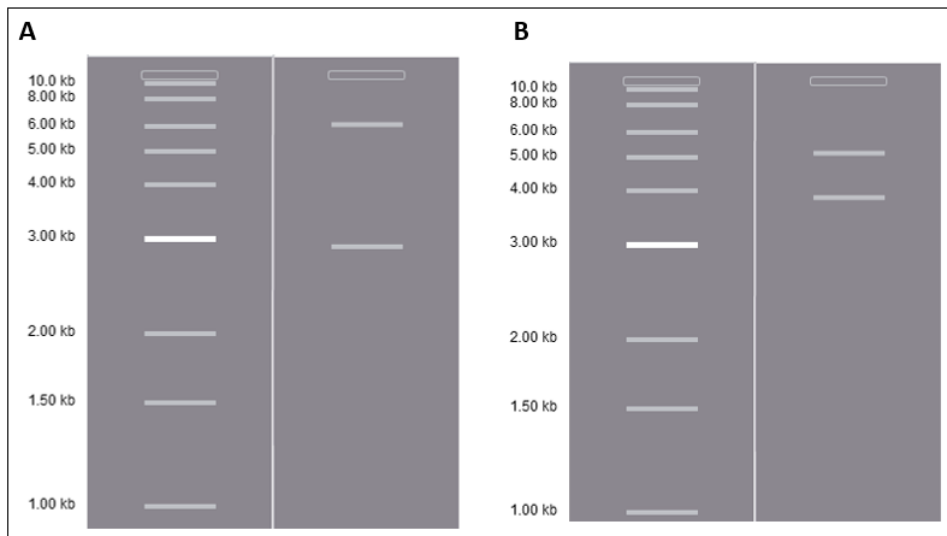


Fonte: Autor.

Legenda: Gel de agarose a 1% do DNA plasmidial após digestão com diferentes enzimas de restrições. M: Padrão de peso molecular 1kb. **1-** Construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 não digerida; **2.1-** Construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *NotI* e *NheI* possuindo um tamanho de aproximadamente 7354pb; **2.2-** Construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *NotI* e *NheI* possuindo um tamanho de aproximadamente 2718pb; **3.1-** Construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *XbaI* e *SphI* possuindo um tamanho de aproximadamente 6322pb; **3.2-** Construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *XbaI* e *SphI* possuindo um tamanho de aproximadamente 2182pb; **3.3-** Construção pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 digerida com *XbaI* e *SphI* possuindo um tamanho de aproximadamente 1568pb.

Nos plasmídeos NS5-eYFP-pCDNA as enzimas utilizadas para a digestão para liberação do gene foi *NotI* e *SacI*, e na digestão que cliva parte do vetor e do gene foi usado *BamHI* e *SmaI*. Na primeira digestão com *NotI* e *SacI* há a formação de duas bandas, uma com 6133pb e outra com 2912pb (**Ilustração 16A**), na segunda digestão com *BamHI* e *SmaI* há a formação de duas bandas, uma com 5171pb e uma 3874pb (**Ilustração 16B**). Todos os clones obtidos liberaram fragmentos de tamanho esperado, confirmando o sucesso das estratégias de clonagem dos vetores (**Ilustração 17**).

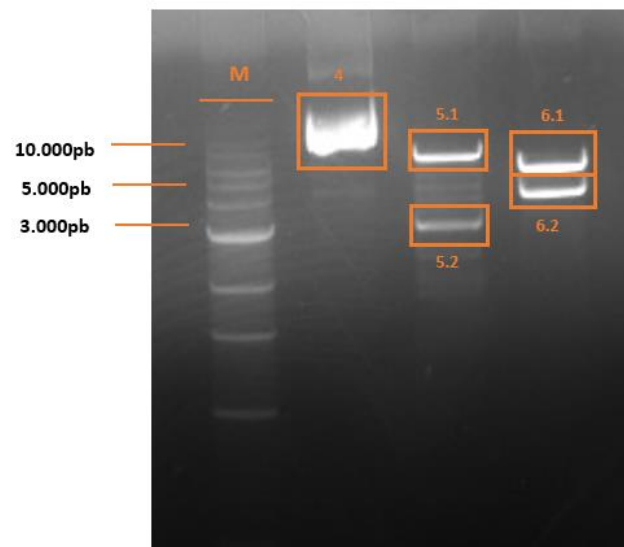
Ilustração 16. Simulação do perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do NS5-eYFP-pCDNA.



Fonte: Autor.

Legenda: Simulação realizada no *GenomeCompiler* para comparação e confirmação dos tamanhos de bandas obtidas. **A-** Simulação da construção NS5-eYFP-pCDNA digerida com *NotI* e *SacI*; **B-** Simulação da construção NS5-eYFP-pCDNA digerida com *BamHI* e *SmaI*.

Ilustração 17. Perfil da corrida eletroforética dos produtos da digestão do NS5-eYFP-pCDNA.



Fonte: Autor.

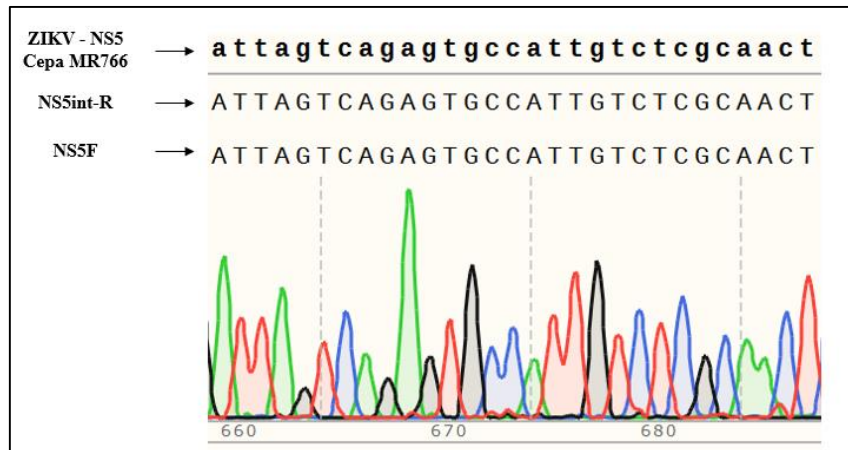
Legenda: Gel de agarose a 1% do DNA plasmidial após digestão com diferentes enzimas de restrições. M: Padrão de peso molecular 1kb. **4-** Construção NS5-eYFP-pCDNA não digerida; **5.1-** Construção NS5-eYFP-pCDNA digerida com *NotI* e *SacI* possuindo um tamanho de aproximadamente 6133pb; **5.2-** Construção NS5-eYFP-pCDNA digerida com *NotI* e *SacI* possuindo um tamanho de aproximadamente 2912pb; **6.1-** Construção NS5-eYFP-pCDNA digerida com *BamHI* e *SmaI* possuindo um tamanho de aproximadamente 5171pb; **6.2-** Construção NS5-eYFP-pCDNA digerida com *BamHI* e *SmaI* possuindo um tamanho de aproximadamente 3874pb.

6.4 Sequenciamento dos genes contidos nos vetores

Os DNA plasmidiais extraídos de 3 clones de cada vetor foram sequenciados nos dois sentidos usando os primers descritos no **Quadro 1** e **Quadro 2**. As análises pós sequenciamento

das sequências consenso revelaram índice de similaridade de 100% das sequências do estudo com os plasmídeos enviados e sequências depositadas no banco de dados do GenBank, confirmando, portanto, que os vetores possuem o gene NS5 do ZIKV, cepa africana (MR766) (**Ilustração 18**), e Natal RGN (**Ilustração 19**) clonados no seu sítio de clonagem.

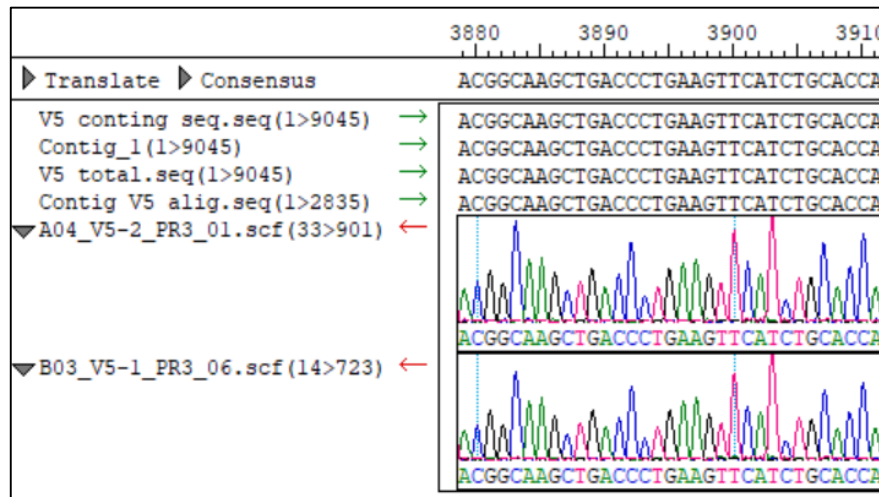
Ilustração 18. Eletroferograma parcial do sequenciamento do gene NS5 da cepa africana.



Fonte: Autor.

Legenda: Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS5 inserido no vetor pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5 usando os *primers* NS5-F e NS5int-R.

Ilustração 19. Eletroferograma parcial do sequenciamento do gene NS5 da cepa Natal RGN.



Fonte: Autor.

Legenda: Eletroferograma parcial representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do gene NS5 inserido no vetor NS5-eYFP-pCDNA.

6.5 Análise da expressão da proteína NS5

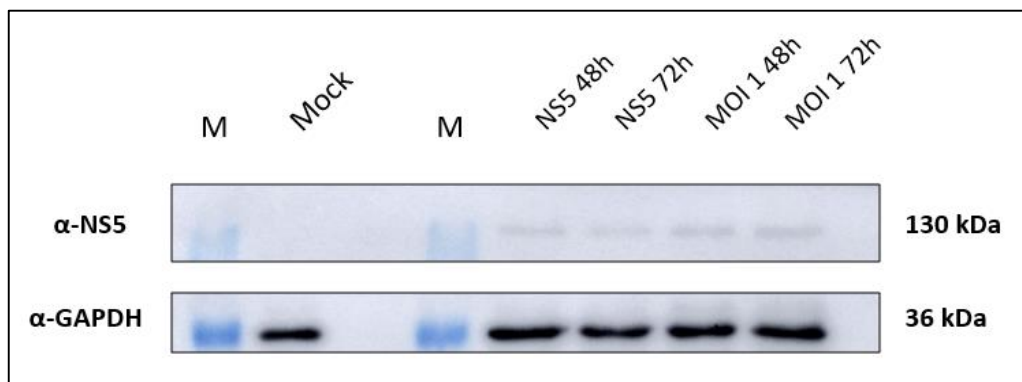
As amostras proteicas utilizadas foram de 40µg para cada grupo, assim, com quantidades totais idênticas, pôde-se comparar a expressão da NS5 nas células infectadas e transfectadas. As células foram colhidas às 48 e 72 horas após a infecção e transfecção,

respectivamente, para avaliação da expressão da NS5 em células HEK293T utilizando análises de Western blotting.

6.5.1 Plasmídeo *pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5*

Nesse experimento foram utilizados 3 grupos, o controle negativo (mock), transfectados com o plasmídeo contendo a NS5 e infectados com MOI 1. Os resultados mostraram que houve expressão da NS5 nos tempos 48h e 72h nos grupos transfectados e infectados (**Ilustração 20**). As bandas se encontraram fracas principalmente porque o anticorpo utilizado, o anti-NS5, é policlonal e há muita formação de bandas inespecíficas.

Ilustração 20. Análise da expressão da proteína NS5 em células HEK293T transfectadas com plasmídeo *pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5* e infectadas.



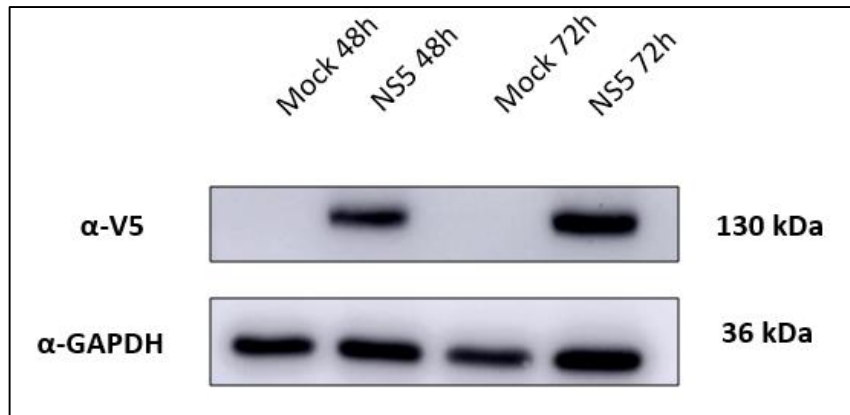
Fonte: Autor.

Legenda: Análise da expressão da proteína NS5 por western blot, em células HEK293T transfectadas com o plasmídeo *pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro_NS5* e infectadas com ZIKV PE 243. A normalização da intensidade das bandas foi realizada usando os níveis na proteína GAPDH como controle endógeno. M: Marcador.

6.5.2 Plasmídeo *NS5-eYFP-pCDNA*

Os resultados mostraram a expressão da proteína NS5 do plasmídeo *NS5-eYFP-pCDNA*, que contém a tag V5, nas 48h e 72h pós-transfecção em lisados celulares (**Ilustração 21**). Não houve expressão no mock em ambos os tempos. A detecção é realizada com o anticorpo anti-V5, pois a tag V5 se encontra fusionada a proteína NS5.

Ilustração 21. Análise da expressão da proteína NS5 em células HEK293T transfectadas com plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.



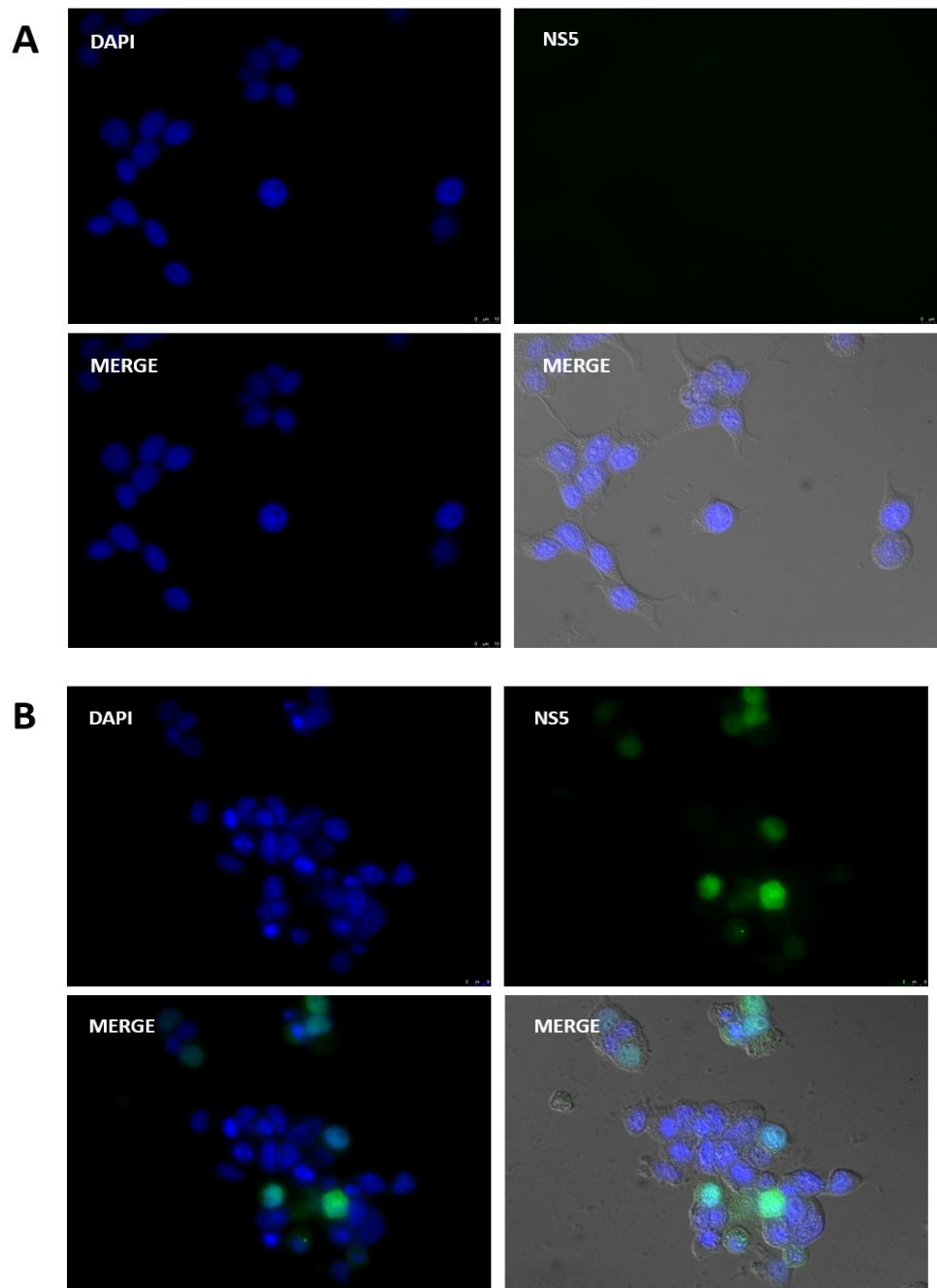
Fonte: Autor.

Legenda: Análise da expressão da proteína NS5, por western blot, em células HEK293T transfectadas com o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA. A normalização da intensidade das bandas foi realizada usando os níveis na proteína GAPDH como controle endógeno.

6.6 Fluorescência em células HEK293T

A expressão do gene NS5 do ZIKV foi confirmada após 48h pós-transfecção. Como a fluorescência YFP está fusionada a proteína NS5, foi apenas observado a fluorescência, sem necessidade de utilização de anticorpos. O controle foi demonstrado na **Ilustração 22A**, observa-se apenas a marcação no núcleo com DAPI em azul sem marcação em verde que indicaria a fluorescência de YFP que se encontra fusionada a NS5. Na **Ilustração 22B** observa-se células transfectadas com o vetor NS5-eYFP-pCDNA, foi revelado que estas proteínas foram expressas e localizadas no núcleo das células HEK293T transfectadas, como observado através da fluorescência verde colocalizada com a marcação do núcleo DAPI em azul.

Ilustração 22. Fluorescência indireta em células HEK293T utilizando o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.



Fonte: Autor.

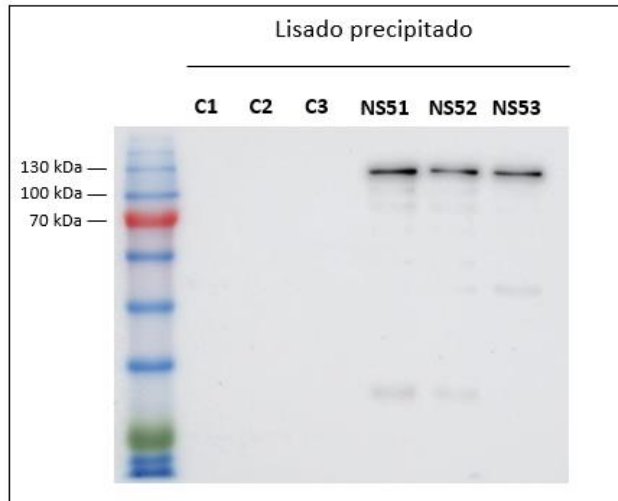
Legenda: (A) Imagens microscópicas de fluorescência em células HEK293T sem transfecção. (B) Imagens microscópicas de fluorescência em células HEK293T após o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA. As imagens foram tiradas 2 dias após a transfecção. NS5 (verde); DAPI (azul). A barra de escala = 10 μ m.

6.7 Imunoprecipitação dos complexos proteicos

Resultados prévios da expressão do plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA serviram para a continuidade dos experimentos, no qual foi realizada a imunoprecipitação (IP) com a finalidade de avaliar os possíveis parceiros funcionais. As amostras deste ensaio foram analisadas por *Western blot* e o resultado demonstrou que as proteínas detectadas no imunoprecipitado

apresentaram os tamanhos esperados de aproximadamente 130 kDa para a proteína NS5 fusionada a tag, não sendo identificado no controle. Assim, os resultados confirmam a presença da proteína nos imunoprecipitados como visto na **Ilustração 23**.

Ilustração 23. Análise da expressão da proteína NS5 em lisados celulares precipitados.

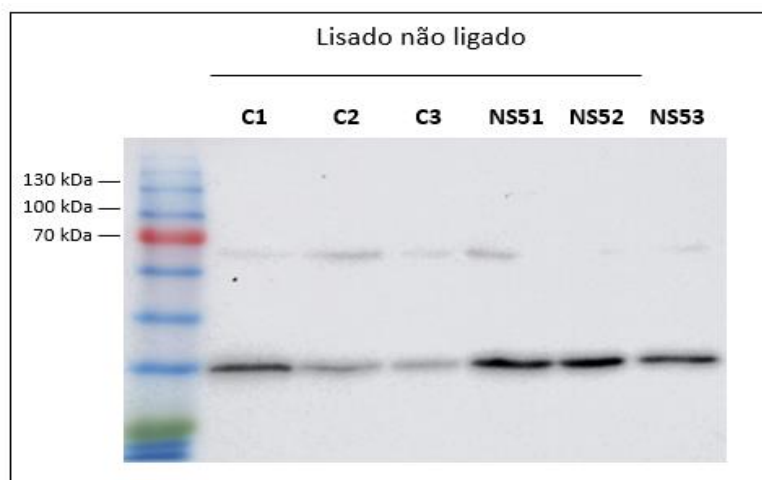


Fonte: Autor.

Legenda: Análise da expressão da proteína NS5, por western blot, dos lisados precipitados da imunoprecipitação das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

Já o lisado não ligado de todas as imunoprecipitações não apresentou bandas para a NS5, indicando que a totalidade das proteínas com a NS5 ficou aderida as esferas magnéticas de proteína G, sendo detectado no western blot para o GAPDH, controle endógeno encontrado em todas as células (**Ilustração 24**).

Ilustração 24. Análise da expressão da proteína NS5 em lisados celulares precipitados.



Fonte: Autor.

Legenda: Análise da expressão da proteína NS5, por western blot, dos lisados não ligados da imunoprecipitação das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

6.8 Espectrometria de massas

Foram analisados os dados da espectrometria de massas tidos com maior razão. Estes dados estão resumidos na **Quadro 1** e levam em conta apenas as proteínas imunoprecipitadas com o NS5 e substancialmente enriquecidas em relação ao lisado celular utilizado como controle negativo nos experimentos de imunoprecipitação.

Foram selecionadas as primeiras 54 proteínas mais enriquecidas de acordo com a razão da intensidade LFQ das amostras transfetadas com o controle. Foi visto que a proteína NS5 foi a mais abundante dentre todos os peptídeos identificados, confirmando assim sua integridade após os processos de lise celular e imunoprecipitação. A segunda proteína com maior razão foi a ZC3H11A, relacionada com a exportação de mRNA nuclear.

Os dados revelaram que a proteína NS5 interage com proteínas de transporte nuclear, como importina 5 (IPO5), importina 7 (IPO7), importina 8 (IPO8) e importina 9 (IPO9). Os resultados de espectrometria de massas revelaram outras proteínas potencialmente parceiras da NS5 e envolvidas em processos biológicas, como as que atuam no processamento e splicing do mRNA, na imunidade inata, na interação vírus-hospedeiro, no ciclo celular, na divisão celular, no dano e reparo do DNA, no ritmo biológico, na apoptose e na regulação da transcrição, de acordo com o banco de dados de proteínas Uniprot.

Também de acordo com o banco de dados de proteínas humanas Uniprot, observamos que a maioria das proteínas precipitadas estão localizadas no núcleo celular, também foi visto em outras regiões como citoplasma, Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndria, peroxissomo, citoesqueleto e região extracelular.

Destas algumas também podem ser de ligação inespecífica, ou mesmo, podem ter sido precipitadas junto a maquinaria de tradução e transcrição. Os resultados obtidos, contudo, podem contribuir de forma significativa para o conhecimento da função desta proteína e devem ser alvo de novos estudos para validação e confirmação da sua interação.

Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

(continua)

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
1	Proteína não-estrutural 5 – Vírus Zika	NS5	54212333	Replicação RNA viral	Núcleo
2	Proteína da família dedo de zinco CCCH 11A	ZC3H11A	1252800	Transporte de mRNA, Transporte	Núcleo
3	Provável RNA helicase DDX20 dependente de ATP	DDX20	1133010	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo, citoplasma
4	Importina 5	IPO5	987380	Interação vírus-hospedeiro, Transporte de proteínas	Núcleo, citoplasma
5	Proteína 4 associada à organela nuclear da gema	GEMIN4	946653,3	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo, citoplasma
6	Matrin 3	MATR3	757073,3	Imunidade inata	Núcleo
7	Subunidade alfa do coatômero	COPA	752706,7	Transporte ER-Golgi, Transporte de proteínas	Golgi, citoplasma
8	Subunidade gama 1 do coatômero	COPG1	680256,7	Transporte ER-Golgi, Transporte de proteínas	Golgi, citoplasma
9	Glicogênio sintase, músculo	GYS1	644303,3	Biossíntese de glicogênio	Citoplasma
10	Isoleucina - tRNA ligase citoplasmática	IARS	637203,3	Biossíntese de proteínas	Citoplasma
11	Leucina - RNAt ligase citoplasmática	LARS	545506,7	Biossíntese de proteínas	Citoplasma
12	Importina 7	IPO7	542076,7	Interação vírus-hospedeiro, Transporte de proteínas	Núcleo, citoplasma
13	U5 Ribonucleoproteína nuclear pequena 116 kda	EFTUD2	518776,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo

Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

(continuação)

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
14	Fator de splicing 3B subunidade 1	SF3B1	489666,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
15	(3R) -3-hidroxiacil-CoA desidratase de cadeia muito longa 3	HACD3	475750	Biossíntese de ácidos graxos, Metabolismo de ácidos graxos, Biossíntese de lipídios, Metabolismo lipídico	Retículo endoplasmático
16	Fator 1 indutor de apoptose, mitocondrial	AIFM1	474006,7	Apoptose	Mitocôndria, núcleo, citoplasma
17	Exonuclease do complexo exossômico RRP44	DIS3	459170	Processamento rRNA	Núcleo, citoplasma
18	tRNA ligase - Glutamato bifuncional / prolina	EPRS	442653,3	Biossíntese de proteínas, Regulação da tradução	Citoplasma
19	Provável rRNA 28S (citosina (4447) -C (5)) - metiltransferase	NOP2	424363,3	Biogênese do ribossomo, Processamento de rRNA	Núcleo
20	Fator de splicing 3B subunidade 3	SF3B3	421296,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
21	Proteína transmembranar 33	TMEM33	418203,3	Dobragem e maturação de proteínas	Núcleo, retículo endoplasmático
22	Proteína ribossômica 60S L29	RPL29	372227	Tradução	citoplasma
23	Exportina T	XPOT	362216,7	Transporte	Núcleo, citoplasma

Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

(continuação)

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
24	Proteína 3 de manutenção estrutural dos cromossomos	SMC3	361253,3	Ciclo celular, Divisão celular, Danos ao DNA, Reparo do DNA, Meiose, Mitose	Núcleo
25	RNA citosina C (5) -metiltransferase NSUN2	NSUN2	361196,7	Ciclo celular, Divisão celular, Diferenciação, Mitose, Espermatogênese, Processamento de tRNA	Núcleo, região extracelular, mitocôndria, citoesqueleto
26	Proteína de ligação a Myb 1A	MYBBP1A	359076,7	Ritmos biológicos, Biogênese do ribossomo, Regulação da transcrição	Núcleo, citoplasma
27	Histona H2A.V	H2AFV	339736,7	Organização da cromatina	Núcleo
28	Proteína biossintética purina trifuncional adenosina-3	GART	330393,3	Biossíntese de purina	Citoplasma, região extracelular
29	Fator de processamento pré-mRNA 6	PRPF6	323983,3	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
30	Proteína 1 de processamento do RNA ribossômico	RRP1B	321110	Apoptose, Interação hospedeiro-vírus, processamento de mRNA, Regulação de transcrição	Núcleo
31	Proteína nucleolar 56	NOP56	306990	Biogênese do ribossomo	Núcleo, citoplasma
32	Fator 3 de iniciação da tradução eucariótica, subunidade C	EIF3C	305763,3	Biossíntese de proteínas	Citoplasma

Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

(continuação)

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
33	Proteína complementar 6 de reparação raio X	XRCC6	302006,7	Danos ao DNA, Recombinação do DNA, Reparo do DNA, Interação vírus-hospedeiro, Imunidade inata, Regulação da transcrição	Núcleo
34	Fator de licenciamento de replicação de DNA MCM3	MCM3	298503,3	Ciclo celular, Replicação do DNA	Núcleo
35	Importina 8	IPO8	296060	Transporte de proteínas	Núcleo, citoplasma
36	Pequena proteína N associada à ribonucleoproteína nuclear	SNRPN	275036,7	Processamento de mRNA	Núcleo
37	Proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos 1A	SMC1A	268530	Ciclo celular, Divisão celular, Danos ao DNA, Reparo do DNA	Núcleo
38	Enoyl-CoA redutase de cadeia muito longa	TECR	265880	Biossíntese e metabolismo dos ácidos graxos, Biossíntese e metabolismo lipídica, Metabolismo de esfingolipídios	Retículo endoplasmático
39	Proteína 2 contendo domínio de ligação a Ran do dedo de zinco	ZRANB2	260210	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
40	Homólogo da proteína 2 do complexo nucleolar	NOC2L	257136,7	Apoptose, Regulação da transcrição	Núcleo

Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

(continuação)

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
41	Subunidade 2 reguladora do proteassoma 26S sem ATPase	PSMD2	243116,7	Imunidade, Ciclo celular, Apoptose, Reparo de DNA, Regulação da transcrição, Modificações pós-traducionais de proteínas	Núcleo, citoplasma, região extracelular
42	Proteína nucleolar 58	NOP58	241810	Biogênese do ribossomo	Núcleo
43	Proteína ribossômica 60S L31	RPL31	233817	Tradução	Citoplasma, região extracelular
44	RNA helicase DDX18 dependente de ATP	DDX18	227996,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
45	Proteína de reparo de incompatibilidade de DNA Msh6	MSH6	227006,7	Danos ao DNA, Reparo do DNA, Interação vírus-hospedeiro	Núcleo
46	RNA citidina acetiltransferase	NAT10	225040	Processamento de rRNA, Processamento de tRNA	Núcleo
47	Fator 3 de iniciação da tradução eucariótica, subunidade D	EIF3D	217716,7	Interação hospedeiro-vírus, Biossíntese de proteínas	Citoplasma
48	Importina 9	IPO9	216356,7	Transporte de proteínas	Núcleo, citoplasma
49	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A0	HNRNPA0	211640	Processamento mRNA, Splicing mRNA, Imunidade	Núcleo
50	Dineína citoplasmática 1 cadeia intermediária leve 1	DYNC1LI1	209823,3	Ciclo celular, Interação vírus-hospedeiro, Transporte	Citoesqueleto

Quadro 3. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

(conclusão)

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
51	3-oxoacil-CoA redutase de cadeia muito longa	HSD17B12	209516,7	Biossíntese lipídica, Metabolismo lipídico, Biossíntese esteróide	Reticulo endoplasmático
52	Proteína 1 de ligação a GTP nucleolar	GTPBP4	209303,3	Biogênese do ribossomo	Núcleo
53	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A3	HNRNPA3	208763,3	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
54	Membro 3 da Subfamília D do Cassete de Ligação de ATP	ABCD3	205113,3	Transporte	Peroxisomos

Fonte: Autor.

Legenda: Quadro com os principais dados da espectrometria de massas, na qual é vista a identidade das proteínas co-imuprecipitadas com a NS5. Para saber a relação da abundância de peptídeos da amostra de interesse, é calculada a razão entre a amostra teste (células transfectadas NS5) e a amostra controle (célula sem está transfectada), que permite a análise da relação da média do LFQ entre os extratos derivados de células que expressam NS5 dividido pela média do LFQ observado nos lisados das células controle. Também é observado o processo biológico que a proteína está envolvida e sua localização subcelular através do UniProt database.

7 DISCUSSÃO

O ZIKV é um arbovírus emergente e ganhou repercussão internacional nos últimos anos se tornando um dos flavivirus 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 e adultos atraiu a atenção global sobre a necessidade de estudar e compreender o mecanismo de patogênese viral. Apesar do enorme avanço no conhecimento a respeito do vírus, ainda se faz necessário estudar o tropismo e o impacto do ZIKV sobre a biologia celular e como esses fatores comprometem o desenvolvimento. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar possíveis interações entre a proteína viral NS5 e proteínas do hospedeiro, bem como sua distribuição intracelular, analisando, dessa maneira, potenciais mecanismos que explicassem a capacidade do vírus de replicação e inibição da resposta imune inata.

A proteína NS5 é a maior proteína codificada pelo genoma do flavivírus e contém pelo menos duas atividades enzimáticas essenciais para a replicação do vírus: uma metiltransferase (MTase) dentro do domínio N-terminal e uma RNA polimerase dependente (RdRp) no C-terminal (DUAN et al., 2017). Além dessas funções enzimáticas, NS5 dos flavivírus foi implicado em outros processos celulares, mais notavelmente na modulação do sistema imune e pró-inflamatório inato (GRANT et al., 2016; YE et al., 2017). Portanto, uma análise completa das interações do NS5 é fundamental para gerar novas descobertas sobre patogênese flaviviral, bem como para fornecer um alvo rico para o desenvolvimento futuro de medicamentos. Atualmente, a literatura baseia-se nas interações da NS5 de outros flavivirus, como no caso da Dengue, que é amplamente estudada (BRETON et al., 2011; KUMAR et al., 2013; PRYOR et al., 2007).

No presente estudo foi observado que a localização subcelular da proteína NS5 está presente na fração nuclear e citoplasmática da célula, observado por fluorescência. Este resultado corroborou com outros estudos que confirmam que o NS5 se localiza no núcleo durante a infecção viral e superexpressão da proteína, sendo observado em células Vero, HeLa, Huh-7, LN229, C6/36 e HEK293T que expressam o ZIKV NS5, assim sugere-se que a localização nuclear vinda do ZIKV NS5 é independente do tipo de célula (GRANT et al., 2016; HERTZOG et al., 2018; KOVANICH et al., 2019; NG et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

Zhao e colaboradores revelaram que a localização subcelular da NS5 do ZIKV contribui para a capacidade inibitória na transcrição de IFN-1, através do bloqueio da ativação do IRF3 e da produção de IFN-1, observaram ainda que nas construções com NS5 mutante houve o seu

acumulo no citoplasma, além da inibição significativa da produção de IFN- β e a ativação do IRF3 (ZHAO et al., 2019). Este resultado apoia que a localização nuclear do ZIKV NS5 é importante para a propagação viral (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2013; ZHAO et al., 2019).

Estudo de Ng e colaboradores (2019) também mostraram que a NS5 do ZIKV se localiza predominantemente no núcleo de células infectadas em três cepas examinadas no estudo, que incluem a cepa africana MR766, da Polinésia Francesa (H/PF/2013) e do Brasil (Paraíba 01/2015). No entanto, o que se destaca sobre esta localização subcelular do NS5 do ZIKV é o fato de que se acumulam em estruturas discretas no núcleo, formando estruturas esféricas semelhantes a conchas no núcleo que excluem o DNA, o que é muito diferente da distribuição nuclear mais difusa do NS5 do DENV2 e de outros flavivírus, que também há a observação dela no citoplasma (NG et al., 2019).

Na espectrometria de massas, a proteína de maior razão no nosso estudo foi a proteína da família dedo de zinco CCCH, a ZC3H11A, proteína de ligação à RNA que modula a expressão gênica em eucariotos (BLACKSHEAR, 2002). Houve sobreposição de duas proteínas em comparação com trabalho de Golubeva et al. (2020), a DHX15, um fator envolvido no processamento do pré-mRNA e a PAF1, realizado com hibridização dupla levedura (GOLUBEVA et al., 2020).

A PAF1 também foi encontrada em imunoprecipitações da NS5 do vírus Zika e Encefalite japonesa (KOVANICH et al., 2019), sendo considerado um alvo celular conservado da NS5 em flavivírus, este gene é responsável pela codificação da subunidade do complexo fator associado à polimerase (PAF1). Este complexo PAF1 interage com a RNA polimerase II e desempenha um papel no alongamento da transcrição, bem como nas modificações das histonas, incluindo ubiquitilação e metilação (CHEN et al., 2015). Além disso, já foi visto que o knockdown do PAF1 e de outros componentes do PAF1C aumenta a infecciosidade do vírus da Dengue e Zika (SHAH et al., 2018). A purificação por afinidade e a análise por Western blot mostraram que a interação NS5-PAF1C foi conservada em todos os quatro sorotipos de DENV, vírus do Nilo Ocidental (WNV) e ZIKV. Acredita-se que o NS5 pode anular respostas antivirais ligando-se ao PAF1C para inibir a expressão de genes estimulados por interferon (SHAH et al., 2018).

Nosso interactoma ZIKV-NS5 revelou componentes da ubiquitina ligase CUL4-DDB1 como proteínas de ligação a NS5, já evidenciados por Kovanich e colaboradores (KOVANICH et al., 2019), que regulam a progressão do ciclo celular, replicação e resposta a danos no DNA (HIGA et al., 2006). Além disso, foi realizada a comparação do nosso conjunto de dados com

dados de interação ZIKV-hospedeiro da literatura e foi observado 12 proteínas sobrepostas, que incluem HNRNPC, HNRNPH3, LEO1, MATR3, NOC2L, PAF1, RBMX, SF3B1, SF3B3, THRAP3, ZC3H18 e ZRANB2 (COYAUD et al., 2018; SHAH et al., 2018). Notou-se também a presença de proteínas que são comuns em interações de NS5 de outros flavívirus, como CSE1L, EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3L, HNRNPA0, HNRNPA3, LEO1, MATR3, NOC2L, RUVBL1, SRSF7 e ZRANB2 (KOVANICH et al., 2019; MAIO et al., 2016; SAVIDIS et al., 2016).

A literatura demonstra que a proteína NS5 possui como alvo principal as proteínas hospedeiras envolvidas na síntese, processamento e transporte de RNA (COYAUD et al., 2018; MAIO et al., 2016; SHAH et al., 2018). Como esperado, nossa pesquisa revelou proteínas de processamento e splicing do mRNA, como DDX18, DDX20, EFTUD2, GEMIN4, HNRNPA3, PRPF6, SF3B1, SF3B3, SNRPN, proteínas de transporte nuclear como IPO5, IPO7, IPO8, IPO9 e XPOT, e várias enzimas metabólicas, GYS1, HACD3 e TECR. Foi observado também, a interação com o ABCD3/PMP70, proteína da membrana peroxissômica, na literatura já há indícios que o peroxissomo possua alguma função antiviral importante (ODENDALL; KAGAN, 2013).

Nosso painel observou a associação com complexo de fatores de iniciação eucariótico (EIF2B3, EIF2S2, EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3D, EIF3E, EIF3F, EIF3I, EIF3L, EIF4G2), dos quais alguns já foram previamente relatados como proteínas de ligação do hospedeiro candidato ao ZIKV-NS5 (KOVANICH et al., 2019). Proteínas celulares de funções conhecidas mas que não possuem associação direta com a NS5 na literatura foi observada, como IGHA1, proteína da região constante das cadeias pesadas de imunoglobulina (SCHROEDER; CAVACINI, 2010); TMEM33, que regula positivamente a sinalização de resposta de proteína desdobrada mediada por PERK e mediada por IRE1 (SAKABE et al., 2015); e a XRCC6 que desempenha um papel na regulação da resposta imune inata mediada por vírus de DNA, e ainda serve de plataforma para a fosforilação do IRF3 e a subsequente ativação da resposta imune inata pela via cGAS-STING (MORCHIKH et al., 2017).

Shah e colaboradores observaram que a SEC61 inibe a replicação de DENV e ZIKV em células humanas e de mosquitos. Sua função está ligada a inserção co-traducional de proteínas transmembranares na membrana do ER (SHAO; HEGDE, 2011). Embora a SEC61 seja específica de interações com a NS4A, muitas proteínas de flavívirus incluem domínios transmembranares e requerem translocação co-traducional para a membrana do retículo endoplasmático (SHAH et al., 2018). Além disso, foi observado similaridade dos precipitados da NS5 da dengue com este trabalho, na interação das proteínas ALYREF, DDX21, EIF3D,

HNRNPA0, ILF3, MCM7, PHGDH, ZRANB2 (SHAH et al., 2018), sendo PAF1, FAM120A e ZRANB2 validadas por knockdown e western blot (SHAH et al., 2018)

Kovanich e colaboradores, validaram as interações de PAF1, LEO1 e MCM6 com a NS5 da encefalite japonesa (KOVANICH et al., 2019), proteínas estas encontradas também em nosso estudo com a NS5 do ZIKV. Essa validação aconteceu através da superexpressão dessas proteínas e posterior infecção por JEV. Outro membro do complexo de manutenção de minicromossomos (MCM), o MCM7, também presente neste estudo, foi validado em interações com a NS5 do vírus da Dengue (MAIO et al., 2016). Até o momento, existem poucas evidências para vincular o complexo MCM ao RdRp viral, mas já há relatos que no vírus da Influenza, o MCM ajudou na estabilização do complexo de replicação viral durante sua transição do início ao alongamento (KAWAGUCHI; NAGATA, 2007).

Como já mencionado, a proteína viral NS5 se transloca para o núcleo (HANNEMANN et al., 2013; KUMAR et al., 2013; PRYOR et al., 2007), De Maio e colaboradores, observaram um acúmulo evidente de NS5 DENV na fração insolúvel de cromatina, juntamente com a histona H3 e o componente U5 snRNP (MAIO et al., 2016). Tomados por esta evidência, acredita-se que a NS5 pode interagir fisicamente com o spliceossoma quando expressa individualmente em células humanas, assim podendo causar alterações do splicing celular endógeno. Portanto, especula-se que o NS5 é, pelo menos em parte, responsável pela modulação do splicing durante a infecção viral (MAIO et al., 2016). Essa alteração do splicing pode ser consequência da resposta celular à infecção, associada a danos celulares, pode ser um mecanismo viral para neutralizar a resposta antiviral ou favorecer a expressão gênica de fatores pró-virais, portanto, cabe mais estudos para a compreensão (MAIO et al., 2016).

Já era esperado a interação de proteínas não estruturais do zika com grandes complexos proteicos, como a subunidade 26S do complexo proteassoma, como PSMD2, PSMC4, PSMC5, PSMC2, observado no presente trabalho. O proteassoma 26S é a principal protease nas células eucarióticas, responsável pela degradação de proteínas no citosol e no núcleo. Então o proteassoma 26S controla processos celulares essenciais, incluindo o ciclo celular, replicação do DNA, transcrição, transdução de sinal e respostas ao estresse (BHATTACHARYYA et al., 2014; FINLEY, 2009), no nosso caso podemos inferir que também podem desempenhar um papel na degradação de peptídeos estranhos como os produzidos após a infecção por um vírus, por exemplo. Além disso, a PSMD2 liga-se ao domínio intracelular do receptor de fator de necrose tumoral tipo 1 (TAN et al., 2006).

Dentre dessas proteínas do nosso proteoma, algumas já foram correlacionadas com doenças neurológicas como a causada pelo vírus Zika, e outras doenças já conhecidas.

TRMT10C e DNM1L foi correlacionado com microcefalia, DNM1L e SLC25A24 com encefalopatias, CAPN1 com Alzheimer, TFRC e MATR3 com esclerose lateral amiotrófica (ELA), e ABCD3 com doenças desmielinizantes (BEYS-DA-SILVA et al., 2019). Portanto, essas vias de sinalização podem ser a chave para distúrbios neurológicos associados ao ZIKV.

Na literatura, os interactomas da NS5 foram investigados por vários tipos de ensaios, por hibridação dupla de levedura de alto rendimento (Y2H) e identificação de biotina dependente de proximidade em larga escala (BioID) como por sistemas de superexpressão ou em células infectadas, o que poderia explicar parcialmente diferenças entre os trabalhos. Outras pequenas diferenças nos métodos, como vetores de expressão, marcadores de afinidade, diferenças na sequência de aminoácidos entre as cepas de vírus utilizadas, também podem contribuir para as diferenças entre os estudos.

Deve-se levar em conta que este trabalho descreve interações que ocorrem através da superexpressão da NS5 e que não leva em conta algumas interações proteína-vírus-hospedeiro que só podem ser observadas no contexto de uma infecção viral. Por fim, o aumento da compreensão da rede de interação vírus-hospedeiro no nível molecular trará novas ideias para inibição e controle viral. Esses achados podem fornecer novas informações sobre os mecanismos para a evasão imune inata e a patogênese do ZIKV.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo fornece novos dados sobre o mapa de interação do ZIKV-NS5 em células progenitoras HEK293T. As funções das proteínas que interagem com a NS5 do ZIKV são diversas, variando de proteínas envolvidas no processamento de RNA, transcrição, tradução, transporte de proteínas, ciclo celular, imunidade e enzimas metabólicas. Algumas das interações foram previamente identificadas em outros flavivírus, como Dengue e Encefalite Japonesa, sugerindo assim que podem desempenhar algum papel no ciclo de replicação dos flavivírus.

A localização nuclear da NS5 do vírus Zika pode explicar a interação com proteínas identificadas da espectrometria de massas, mas são necessários mais estudos para elucidar a função desses novos alvos da NS5 durante a infecção.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. G.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R. Revisiting Dengue Virus–Host Cell Interaction. **Advances in virus research**, Amsterdã, v. 88, p. 1–109, 2014.
- ADAMS WALDORF, K. M. *et al.* Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nature medicine**, Londres, v. 22, n. 11, p. 1256–1259, 2016.
- AGUIRRE, S. *et al.* DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. **PLoS pathogens**, São Francisco, v. 8, n. 10, p. e1002934, 2012.
- AID, M. *et al.* Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**, Cambridge, v. 169, n. 4, p. 610–620.e14, 2017.
- ALERA, M. T. *et al.* Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 21, n. 4, p. 722–724, 2015.
- AMARAL, J. D. *et al.* The Role of p53 in Apoptosis. **Discovery Medicine**, Maryland, v. 9, n. 45, p. 145–152, 2010.
- AMBROSE, R. L.; MACKENZIE, J. M. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. **Journal of virology**, Washington, v. 85, n. 6, p. 2723–2732, 2011.
- ANDRAL, L. *et al.* Studies on yellow fever in Ethiopia. 3. Serological and virological studies of the woodland fauna. **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, v. 38, n. 6, p. 855–861, 1968.
- ARAGAO, M. F. V. *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, Londres, v. 353, p. i1901, 2016.
- ASHOUR, J. *et al.* NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of virology**, Washington, v. 83, n. 11, p. 5408–5418, 2009.
- AUBRY, M. *et al.* Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, Massachusetts, v. 41, p. 11–12, 2015.
- BANANI, S. F. *et al.* Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 18, n. 5, p. 285–298, 2017.
- BARBER, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 8, n. 2, p. 113–126, 2001.
- BARCELLOS, C. *et al.* Increased Hospitalizations for Neuropathies as Indicators of Zika Virus Infection, according to Health Information System Data, Brazil. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 11, p. 1894–1899, 2016.
- BARONTI, C. *et al.* Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. **Genome announcements**, Washington, v. 2, n. 3, p. e00500-14, 2014.
- BAUD, D. *et al.* An update on Zika virus infection. **Lancet**, Londres, v. 390, n. 10107, p. 2099–

2109, 2017.

BAYLESS, N. L. *et al.* Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 423–428, 2016.

BEARCROFT, W. G. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 442–448, 1956.

BERTHET, N. *et al.* Molecular Characterization of Three Zika Flaviviruses Obtained from Sylvatic Mosquitoes in the Central African Republic. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Nova York, v. 14, n. 12, p. 862–865, 2014.

BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, Estocolmo, v. 19, n. 13, p. 8–11, 2014.

BEST, S. M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. **Journal of virology**, Washington, v. 91, n. 3, 2017.

BEYS-DA-SILVA, W. *et al.* Zika Virus Infection of Human Mesenchymal Stem Cells Promotes Differential Expression of Proteins Linked to Several Neurological Diseases. **Molecular Neurobiology**, Nova York, v. 56, n. 7, p. 4708–4717, 2019.

BHATNAGAR, J. *et al.* Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 23, n. 3, p. 405–414, 2017.

BHATTACHARYYA, S. *et al.* Regulated protein turnover: Snapshots of the proteasome in action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 15, n. 2, p. 122–133, 2014.

BLACKSHEAR, P. J. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. **Biochemical Society Transactions**, Londres, v. 30, n.6, p.945–952, 2002.

BRASIL, P. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **The New England journal of medicine**, Waltham, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 47, n. 38, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018. Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 47, n. 38, 2018a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 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. Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 47, n. 38, 2018b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios, 2015 a 2019. Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 47, n. 38, 2019.

- BRESSANELLI, S. *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **The EMBO journal**, Weinheim, v. 23, n. 4, p. 728–738, 2004.
- BRETON, M. *et al.* Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. **BMC Microbiology**, Nova York, v. 11, n. 1, p. 234, 2011.
- BROOKS, A. J. *et al.* The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, v. 277, n. 39, p. 36399–36407, 2002.
- BUATHONG, R. *et al.* Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arligton, v. 93, n. 2, p. 380–383, 2015.
- BUCKLEY, A.; GOULD, E. A. Detection of Virus-specific Antigen in the Nuclei or Nucleoli of Cells Infected with Zika or Langkat Virus. **Journal of General Virology**, Londres, v. 69, n. 8, p. 1913–1920, 1988.
- CAMACHO, E. *et al.* Detection of Autochthonous Zika Virus Transmission in Sincelejo, Colombia. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 5, p. 927–929, 2016.
- CAMPOS, G.; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, Londres, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.
- CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. **Lancet**, Londres, v. 384, n. 9954, p. 1571–1572, 2014.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.
- CARDIFF, R. D.; DALRYMPLE, J. M.; RUSSELL, P. K. RNA polymerase in group B arbovirus (dengue-2) infected cells. **Archives of Virology**, Amsterdã, v. 40, n. 3–4, p. 392–396, 1973.
- CARDIFF, R. D.; LUND, J. K. Distribution of dengue-2 antigens by electron immunocytochemistry. **Infection and immunity**, Washington, v. 13, n. 6, p. 1699–1709, 1976.
- CARDOSO, C. W. *et al.* Outbreak of Exanthematous Illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.
- CAROD-ARTAL, F. J. *et al.* Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet Neurology**, Londres, v. 12, n. 9, p. 906–919, 2013.
- CARVALHO, F. H. C. *et al.* Associated ultrasonographic findings in fetuses with microcephaly because of suspected Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy. **Prenatal Diagnosis**, Malden, v. 36, n. 9, p. 882–887, 2016.
- CAUCHEMEZ, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **Lancet**, Londres, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). Outcomes of Pregnancies with Laboratory Evidence of Possible Zika Virus Infection, 2015-2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/data/pregnancy-outcomes.html>. **Centers for Disease Control and Prevention**: Atlanta, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Zika Cases in the United States**. **Centers for Disease Control and Prevention**: Atlanta, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2016 Case Counts in the US. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/reporting/2016-casecounts.html>. **Centers for Disease Control and Prevention**: Atlanta, 2016.

CERBINO-NETO, J. *et al.* Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1318–1320, 2016.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 22, p. 8898–8902, 1990.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: Identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. **Virology**, Amsterdã, v. 169, n. 1, p. 100–109, 1989.

CHATEL-CHAIX, L. *et al.* A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. **Journal of virology**, Washington, v. 89, n. 14, p. 7170–7186, 2015.

CHAUDHARY, V. *et al.* Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. **Journal of virology**, Washington, v. 91, n. 14, p. e00163-17, 2017.

CHEN, F. X. *et al.* PAF1, a Molecular Regulator of Promoter-Proximal Pausing by RNA Polymerase II. **Cell**, Cambridge, v. 162, n. 5, p. 1003–1015, 2015.

CHIMELLI, L. *et al.* The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. **Acta Neuropathologica**, Amsterdã, v. 133, n. 6, p. 983–999, 2017.

CHRAÏBI, S. *et al.* Two cases of thrombocytopenic purpura at onset of Zika virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v. 83, p. 61–62, 2016.

COYAUD, E. *et al.* Global interactomics uncovers extensive organellar targeting by Zika Virus. **Molecular and Cellular Proteomics**, Rockville, v. 17, n. 11, p. 2242–2255, 2018.

CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, Nova York, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

CUMBERWORTH, S. L. *et al.* Inhibition of type I interferon induction and signalling by mosquito-borne flaviviruses. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. e12737, 2017.

CUNHA, M. S. *et al.* First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. **Genome announcements**, Washington, v. 4, n. 2, p. e00032-16, 2016.

DAI, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus

- Broadly Protective Antibody. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.
- 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, 2016.
- DARWISH, M. A. *et al.* A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 77, n. 4, p. 442–445, 1983.
- DECROLY, E. *et al.* Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. **Nature Reviews Microbiology**, Nova York, v. 10, n. 1, p. 51–65, 2012.
- DEVNARAIN, N.; SOLIMAN, M. E. S. A panoptic uncovering of the dynamical evolution of the Zika Virus NS5 methyltransferase binding site loops-zeroing in on the molecular landscape. **Chemical Biology & Drug Design**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 1838–1850, 2018.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and Serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DICK, G. W. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 13–48, 1953.
- DODSON, B. L.; RASGON, J. L. Vector competence of Anopheles and Culex mosquitoes for Zika virus. **PeerJ**, San Diego v. 5, p. e3096, 2017.
- DONALD, C. L. *et al.* Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v. 10, n. 10, p. e0005048, 2016.
- DRIGGERS, R. W. *et al.* Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **The New England journal of medicine**, Waltham, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016.
- DUAN, W. *et al.* The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. **The EMBO journal**, Weinheim, v. 36, n. 7, p. 919–933, 2017.
- DUDLEY, D. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, Nova York, v. 7, n. 1, p. 12204, 2016.
- DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. *et al.* Infectious Zika viral particles in breastmilk. **The Lancet**, Londres, v. 387, n. 10023, p. 1051, 2016.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. *et al.* Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.
- EGLOFF, M. P. *et al.* An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO journal**,

Weinheim, v. 21, n. 11, p. 2757–2768, 2002.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Scientific reports**, Nova York, v. 8, n. 1, p. 809, 2018.

ELONG NGONO, A. *et al.* Mapping and Role of the CD8⁺ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 35–46, 2017.

ERRETT, J. S. *et al.* The Essential, Nonredundant Roles of RIG-I and MDA5 in Detecting and Controlling West Nile Virus Infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 21, p. 11416–11425, 2013.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Rapid Risk Assessment: Zika Virus Infection Outbreak, French Polynesia. Estocolmo: **European Centre For Disease Prevention and Control**, 2014.

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

FALGOUT, B. *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of virology**, Washington, v. 65, n. 5, p. 2467–2475, 1991.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 374, n. 7, p. 601–604, 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. e2636, 2014.

FERREIRA-DE-BRITO, A. *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 655–658, 2016.

FINLEY, D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 78, n. 1, p. 477–513, 2009.

FONTES-GARFIAS, C. R. *et al.* Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. **Cell reports**, Cambridge, v. 21, n. 5, p. 1180–1190, 2017.

FORWOOD, J. K. *et al.* The 37-Amino-Acid Interdomain of Dengue Virus NS5 Protein Contains a Functional NLS and Inhibitory CK2 Site. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdã, v. 257, n. 3, p. 731–737, 1999.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

GALLIEZ, R. M. *et al.* Zika Virus Causing Encephalomyelitis Associated With Immunoactivation. **Open forum infectious diseases**, Oxford, v. 3, n. 4, 2016.

GHOZZI, V. E. *et al.* ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly. **Cell death & disease**, Nova York, v. 7, n. 10, p. e2440, 2016.

GILLESPIE, L. K. *et al.* The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. **Journal of virology**, Washington, v. 84, n.

20, p. 10438–10447, 2010.

GLADWYN-NG, I. *et al.* Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. **Nature Neuroscience**, Nova York, v. 21, n. 1, p. 63–71, 2018.

GOLUBEVA; N. *et al.* Network of Interactions between ZIKA Virus Non-Structural Proteins and Human Host Proteins. **Cells**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 153, 2020.

GOODFELLOW, J. A.; WILLISON, H. J. Guillain–Barré syndrome: a century of progress. **Nature Reviews Neurology**, Nova York, v. 12, n. 12, p. 723–731, 2016.

GOULD, E. A. *et al.* Examination of the Immunological Relationships between Flaviviruses Using Yellow Fever Virus Monoclonal Antibodies. **Journal of General Virology**, Londres, v. 66, n. 7, p. 1369–1382, 1985.

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

GRARD, G. *et al.* Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? (R. Charrel, Ed.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, n. 2, p. e2681, 2014.

GRUN, J. B.; BRINTON, M. A. Separation of Functional West Nile Virus Replication Complexes from Intracellular Membrane Fragments. **Journal of General Virology**, Londres, v. 69, n. 12, p. 3121–3127, 1988.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and Emergence of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 216, n. suppl 10, p. S860–S867, 2017.

GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging microbes & infections**, Londres, v. 5, n. 9, p. e102, 2016.

GUYATT, K. J.; WESTAWAY, E. G.; KHROMYKH, A. A. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. **Journal of Virological Methods**, Amsterdã, v. 92, n. 1, p. 37–44, 2001.

HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

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

HANNEMANN, H. *et al.* Serotype-specific differences in dengue virus non-structural protein 5 nuclear localization. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, v. 288, n. 31, p. 22621–22635, 2013.

HARRIS, E. *et al.* Molecular biology of flaviviruses. *In*: BOCK, G.; GOODE, J. (ed.). **New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases**. 1st ed. Nova York: Wiley, v. 277, p. 23–40, 2006.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2009.

HAZIN, A. N. *et al.* Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 374, n. 22, p. 2193–2195, 2016.

- HEANG, V. *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 18, n. 2, p. 349–351, 2012.
- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, Washington, v. 81, n. 1, p. e00055-16, 2017.
- HEMERT, F. VAN; BERKHOUT, B. Nucleotide composition of the Zika virus RNA genome and its codon usage. **Virology journal**, Nova York, v. 13, p. 95, 2016.
- HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 3, p. 55–58, 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, n. 7, p. 1120–1136, 2018.
- HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Nova York, v. 13, n. 2, p. 89–102, 2012.
- HIGA, L. A. *et al.* CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. **Nature Cell Biology**, Nova York, v. 8, n. 11, p. 1277–1283, 2006.
- HILLS, S. L. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, Atlanta, v. 65, n. 8, p. 215–216, 2016.
- HISCOX, J. A. The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. **Virus Research**, Amsterdã, v. 95, n. 1–2, p. 13–22, 2003.
- HO, C. Y. *et al.* Differential neuronal susceptibility and apoptosis in congenital Zika virus infection. **Annals of Neurology**, Weinheim, v. 82, n. 1, p. 121–127, 2017.
- HOU, W. *et al.* Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. **Gene**, Amsterdã, v. 628, p. 117–128, 2017.
- IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, Amsterdã, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.
- JIANG, X. *et al.* Proteomic analysis of Zika virus infected primary human fetal neural progenitors suggests a role for doublecortin in the pathological consequences of infection in the cortex. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 1067, p. 1–15, 2018.
- JOHANSSON, M. *et al.* A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. **Journal of General Virology**, Londres, v. 82, n. 4, p. 735–745, 2001.
- JOUANNIC, J. M. *et al.* Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**, Londres, v. 387, n. 10023, p. 1051–1052, 2016.
- KAWAGUCHI, A.; NAGATA, K. De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. **EMBO Journal**, Weinheim, v. 26, n. 21, p.

4566–4575, 2007.

KILBOURN, A. M. *et al.* Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 39, n. 1, p. 73–83, 2003.

KOVANICH, D. *et al.* Analysis of the Zika and Japanese Encephalitis Virus NS5 Interactomes. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 18, n. 8, p. 3203–3218, 2019.

KUMAR, A. *et al.* Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling. **Journal of virology**, Washington, v. 87, n. 8, p. 4545–4557, 2013.

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

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 7270–7279, 2002.

KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

KUO, M. D. *et al.* Characterization of the NTPase Activity of Japanese Encephalitis Virus NS3 Protein. **Journal of General Virology**, Londres, v. 77, n. 9, p. 2077–2084, 1996.

KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v. 89, n. 3, p. 516–517, 2013.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LARENA, M. *et al.* Pivotal role of antibody and subsidiary contribution of CD8+ T cells to recovery from infection in a murine model of Japanese encephalitis. **Journal of virology**, Washington, v. 85, n. 11, p. 5446–5455, 2011.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of virology**, Washington, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 2016.

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

LAZEAR, H. M. *et al.* Beta interferon controls West Nile virus infection and pathogenesis in mice. **Journal of virology**, Washington, v. 85, n. 14, p. 7186–7194, 2011.

LESCAR, J. *et al.* The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity. In: Hilgenfeld R., Vasudevan S. (eds) *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Singapura, vol 1062, 2018.

LESSLER, J. *et al.* Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, Washington, v. 353, n. 6300, p. aaf8160, 2016.

- LEUNG, J. Y. *et al.* Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of virology**, Washington, v. 82, n. 10, p. 4731–41, 2008.
- LI, Y. *et al.* Membrane topology of NS2B of dengue virus revealed by NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdã, v. 1848, n. 10, p. 2244–2252, 2015.
- 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. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.
- LIM, P. Y. *et al.* Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. **Journal of virology**, Washington, v. 85, n. 10, p. 5197–5201, 2011.
- LIMA, N. S. *et al.* T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. **Trends in immunology**, Cambridge, v. 38, n. 8, p. 594–605, 2017.
- LIN, H. *et al.* Zika virus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnology Advances**, Amsterdã, v. 36, n. 1, p. 47–53, 2018.
- LIN, S. *et al.* Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. **Virology**, Amsterdã, v. 527, p. 180–187, 2019.
- LINDEN, V. *et al.* Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. **BMJ (Clinical research ed.)**, Londres, v. 354, p. i3899, 2016.
- LINDEN, V. *et al.* Discordant clinical outcomes of congenital Zika virus infection in twin pregnancies. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 75, n. 6, p. 381–386, 2017.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **Journal of virology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 9608–9617, 1997.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. **Journal of virology**, Washington, v. 73, p. 4611–4621, 1999.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, Amsterdã, v. 59, p. 23–61, 2003.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**. 5ª Edição, Riverwoods, p.1101–1151, 2007.
- LOO, Y. M.; GALE, M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**, Cambridge, v. 34, n. 5, p. 680–692, 2011.
- LOURENÇO, J. *et al.* Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. **PLoS Currents**, São Francisco, 2018.
- LUO, D. *et al.* Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. **The EMBO journal**, Weinheim, v. 27, n. 23, p. 3209–3219, 2008.
- MA, W. *et al.* Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, Cambridge, v. 167, n. 6, p. 1511–1524.e10, 2016.

- MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. **Virology**, Amsterdã, v. 220, n. 1, p. 232–240, 1996.
- MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of virology**, Washington, v. 75, n. 22, p. 10787–10799, 2001.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MAIO, F. A. *et al.* The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. (T. C. Pierson, Ed.). **PLOS Pathogens**, São Francisco, v. 12, n. 8, p. e1005841, 2016.
- MALTA, J. M. A. S. *et al.* Guillain-Barré syndrome and other neurological manifestations possibly related to Zika virus infection in municipalities from Bahia, Brazil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 26, n. 01, p. 09–18, 2017.
- MANANGEESWARAN, M.; IRELAND, D. D. C.; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. (R. S. Klein, Ed.). **PLOS Pathogens**, São Francisco, v. 12, n. 11, p. e1006004, 2016.
- MANSUY, J. M. *et al.* Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **The Lancet Infectious Diseases**, Londres, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969.
- MARCONDES, C. B. *et al.* 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, 2015.
- MARTINES, R. B. *et al.* Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **The Lancet**, Londres, v. 388, n. 10047, p. 898–904, 2016.
- MCCARTHY, M. Four in Florida are infected with Zika from local mosquitoes. **BMJ (Clinical research ed.)**, Londres, v. 354, p. i4235, 2016.
- MCLEAN, J. E. *et al.* Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, v. 286, n. 25, p. 22147–22159, 2011.
- MÉCHARLES, S. *et al.* Acute myelitis due to Zika virus infection. **The Lancet**, Londres, v. 387, n. 10026, p. 1481, 2016.
- MELO, A. S. *et al.* Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. **JAMA Neurology**, Chicago, v. 73, n. 12, p. 1407–1416, 2016.
- MICROCEPHALY EPIDEMIC RESEARCH GROUP. Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 6, p. 1090–1093, 2016.

- MILLER, S. *et al.* The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, v. 282, n. 12, p. 8873–8882, 2007.
- 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, 2016a.
- MINER, J. J. *et al.* Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. **Cell reports**, Cambridge, v. 16, n. 12, p. 3208–3218, 2016b.
- MOORE, D. L. *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Annals of tropical medicine and parasitology**, Londres, v. 69, n. 1, p. 49–64, 1975.
- MORCHIKH, M. *et al.* HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 67, n. 3, p. 387- 399.e5, 2017.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, Nova York, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- MUÑOZ-JORDÁN, J. L. *et al.* Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. **Journal of virology**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8004–8013, 2005.
- MUÑOZ-JORDAN, J. L. *et al.* Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 24, p. 14333–14338, 2003.
- MURRAY, K. O. *et al.* Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 23, n. 1, p. 99–101, 2017.
- MUSSO, D. *et al.* Zika virus in French Polynesia 2013-14: anatomy of a completed outbreak. **The Lancet. Infectious diseases**, Londres v. 18, n. 5, p. e172–e182, 2018.
- MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, Estocolmo, v. 19, n. 14, p. 20761, 2014.
- MUSSO, D. *et al.* Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.
- NASCIMENTO, O. J. M. *et al.* Zika Virus Infection–associated Acute Transient Polyneuritis. **Neurology**, Minneapolis, v. 88, n. 24, p. 2330–2332, 2017.
- NG, I. *et al.* Zika Virus NS5 Forms Supramolecular Nuclear Bodies That Sequester Importin- α and Modulate the Host Immune and Pro-Inflammatory Response in Neuronal Cells. **ACS Infectious Diseases**, Washington, v. 5, n. 6, p. 932–948, 2019.
- 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**, Estocolmo, v. 21, n. 32, p. 30314, 2016.
- NOVOA, R. R. *et al.* Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. **Biology of the Cell**, Hoboken, v. 97, n. 2, p. 147–172, 2005.
- ODENDALL, C.; KAGAN, J. C. Peroxisomes and the antiviral responses of mammalian cells.

Subcellular Biochemistry, Nova York, v. 69, p. 67–75, 2013.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, Estocolmo, v. 19, n. 9, p. 20720, 2014.

OJHA, C. R. *et al.* Complementary Mechanisms Potentially Involved in the Pathology of Zika Virus. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 9, p. 2340, 2018.

OLIVEIRA-SZEJNFELD, P. S. *et al.* Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. **Radiology**, Oak Brook, v. 281, n. 1, p. 203–218, 2016.

OLMO, I. G. *et al.* Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1016, 2017.

OLSON, J. G. *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. 2576–2592, 2016.

OSUNA, C. E. *et al.* Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nature Medicine**, Nova York, v. 22, n. 12, p. 1448–1455, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Zika - Epidemiological Update**. Washington, D. C., 2016.

PARDY, R. D. *et al.* Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. (A. J. Sant, Ed.) **PLOS Pathogens**, São Francisco, v. 13, n. 2, p. e1006184, 2017.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, Amsterdã, v. 2, n. 2, p. 168–175, 2012.

PINTO, A. K. *et al.* Deficient IFN Signaling by Myeloid Cells Leads to MAVS-Dependent Virus-Induced Sepsis. (M. U. Gack, Ed.) **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 10, n. 4, p. e1004086, 2014.

PLEVKA, P. *et al.* Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. **EMBO reports**, Weinheim, v. 12, n. 6, p. 602–606, 2011.

PRISANT, N. *et al.* Zika virus in the female genital tract. **The Lancet Infectious Diseases**, Londres, v. 16, n. 9, p. 1000–1001, 2016.

PRYOR, M. J. *et al.* Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Through Its Importin α/β -Recognized Nuclear Localization Sequences is Integral to Viral Infection. **Traffic**, Encinitas, v. 8, n. 7, p. 795–807, 2007.

PYKE, A. T. *et al.* Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. **PLoS currents**, São Francisco, v. 6, 2014.

QUICKE, K. M. *et al.* Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 20, n. 1, p. 83–90, 2016.

- RABONI, S. M. *et al.* Flavivirus cross-reactivity in serological tests and Guillain-Barré syndrome in a hematopoietic stem cell transplant patient: A case report. **Transplant Infectious Disease**, Hoboken, p. e12700, 2017.
- RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: E. F. Flores (Ed.); **Virologia Veterinária**. 1 edição, Santa Maria, p.563–592, 2007.
- RIVINO, L.; LIM, M. Q. CD4 + and CD8 + T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. **Immunology**, Hoboken, v. 150, n. 2, p. 146–154, 2017.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Londres, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 2010.
- ROSENDAAL, J. *et al.* Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. **Journal of virology**, Washington, v. 80, n. 9, p. 4623–4632, 2006.
- ROSÁRIO, M. S. *et al.* Guillain-Barré Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v. 95, n. 5, p. 1157–1160, 2016.
- ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, Estocolmo, v. 19, n. 41, p. 20929, 2014.
- SAKABE, I. *et al.* TMEM33: a new stress-inducible endoplasmic reticulum transmembrane protein and modulator of the unfolded protein response signaling. **Breast Cancer Research and Treatment**, Nova York, v. 153, n. 2, p. 285–297, 2015.
- SAMUEL, G. H. *et al.* Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 113, n. 48, p. 13863–13868, 2016.
- SAVIDIS, G. *et al.* Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. **Cell Reports**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 232–246, 2016.
- SCHRÖDER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Londres, v. 65, n. 6, p. 862–894, 2008.
- SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Iowa City, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, 2010.
- SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **Morbidity and mortality weekly report**, Atlanta, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.
- SEJVAR, J. J. *et al.* Population incidence of Guillain-Barré syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Neuroepidemiology**, Basel, v. 36, n. 2, p. 123–133, 2011.
- SELISKO, B. *et al.* Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. **Virology**, Amsterdã, v. 351, n. 1, p. 145–158, 2006.
- SELISKO, B. *et al.* Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. **Current Opinion**

in **Virology**, Amsterdã, v. 9, p. 74–83, 2014.

SHAH, P. S. *et al.* Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 175, n. 7, p. 1931–1945.e18, 2018.

SHAO, S.; HEGDE, R. S. Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 25–56, 2011.

SHARP, T. M. *et al.* Zika Virus Infection Associated With Severe Thrombocytopenia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, Oxford, v. 63, n. 9, p. 1198–1201, 2016.

SHIRYAEV, S. A. *et al.* NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. **The Journal of general virology**, Londres, v. 90, n. Pt 9, p. 2081–2085, 2009.

SILVENNOINEN, O. *et al.* Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. **Science**, Washington, v. 261, n. 5129, p. 1736–1739, 1993.

SIMPSON, D. I. H. Zik Virus Infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 335–337, 1964.

SITATI, E. M.; DIAMOND, M. S. CD4+ T-Cell Responses Are Required for Clearance of West Nile Virus from the Central Nervous System. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 10, p. 8032–8036, 2006.

SMIT, J. M. *et al.* Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, Basel, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.

SOARES, C. N. *et al.* Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v. 83, p. 63–65, 2016.

SOARES, C. N. *et al.* Oligosymptomatic dengue infection: A potential cause of Guillain Barré syndrome. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 66, n. 2 A, p. 234–237, 2008.

STETTLER, K. *et al.* Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, Washington, v. 353, n. 6301, p. 823–826, 2016.

SUN, J. *et al.* Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. **JAMA Ophthalmology**, Chicago, v. 134, n. 11, p. 1330, 2016.

SURASOMBATPATTANA, P. *et al.* Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdã, v. 11, n. 7, p. 1664–1673, 2011.

SUTHAR, M. S.; DIAMOND, M. S.; GALE JR, M. West Nile virus infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, Nova York, v. 11, n. 2, p. 115–128, 2013.

SWAMINATHAN, S. *et al.* Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 375, n. 19, p. 1907–1909, 2016.

TABATA, T. *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 20, n. 2, p. 155–

166, 2016.

TAKEDA, H. *et al.* Association of Virus Specific Replicative Ribonucleic Acid with Nuclear Membrane in Chick Embryo Cells Infected with Japanese Encephalitis Virus. **Journal of General Virology**, Londres, v. 38, n. 2, p. 281–291, 1978.

TAN, M. J. A. *et al.* The Potential Role of the ZIKV NS5 Nuclear Spherical-Shell Structures in Cell Type-Specific Host Immune Modulation during ZIKV Infection. **Cells**, Cambridge, v. 8, n. 12, p. 1519, 2019.

TAN, Y. *et al.* Effects of Tumor Necrosis Factor-Alpha on the 26S Proteasome and 19S Regulator in Skeletal Muscle of Severely Scalded Mice. **Journal of Burn Care & Research**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 226–233, 2006.

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.

TAPPE, D. *et al.* Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 21, n. 5, p. 911–913, 2015.

TAY, M. Y. F. *et al.* The C-terminal 50 amino acid residues of dengue NS3 protein are important for NS3-NS5 interaction and viral replication. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, v. 290, n. 4, p. 2379–2394, 2015.

TEO, C. S. H.; CHU, J. J. H. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. **Journal of virology**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1897–1913, 2014.

THE SINGAPORE ZIKA STUDY GROUP. Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, Londres, v. 17, n. 8, p. 813–821, 2017.

THIEL, H. J. *et al.* Family Flaviviridae. In: M. A. Fauquet, Claude M. Mayo; J. Maniloff; U. Desselberger; L. A. Ball (Eds.); **Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. San Diego, p.979–996, 2005.

THOMPSON, M. R. *et al.* Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. **Viruses**, Basel, v. 3, n. 6, p. 920–940, 2011.

THURMOND, S. *et al.* Suppression of Type I Interferon Signaling by Flavivirus NS5. **Viruses**, Basel, v. 10, n. 12, 2018.

TIAN, H. *et al.* The crystal structure of Zika virus helicase: basis for antiviral drug design. **Protein & cell**, Nova York, v. 7, n. 6, p. 450–454, 2016.

TOGNARELLI, J. *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, Amsterdã, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

UCHIL, P. D.; KUMAR, A. V. A.; SATCHIDANANDAM, V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. **Journal of virology**, Washington, v. 80, n. 11, p. 5451–5464, 2006.

UCHIL, P. D.; SATCHIDANANDAM, V. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane

compartments. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, v. 278, n. 27, p. 24388–24398, 2003.

UMAREDDY, I. *et al.* Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **Journal of General Virology**, Londres, v. 87, n. 9, p. 2605–2614, 2006.

VENTURA, L. O. *et al.* Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, Amsterdã, v. 21, n. 4, p.295-299.e2, 2017.

VENTURI, G. *et al.* An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. **Eurosurveillance**, Estocolmo, v. 21, n. 8, p. 1–4, 2016.

WAEHRE, T. *et al.* Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 20, n. 8, p. 1412–1414, 2014.

WANG, W. *et al.* Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nature communications**, Nova York, v. 9, n. 1, p. 106, 2018.

WATEMBERG, N. *et al.* Significance of Microcephaly Among Children With Developmental Disabilities. **Journal of Child Neurology**, Thousand Oaks, v. 17, n. 2, p. 117–122, 2002.

WEN, J. *et al.* Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8⁺ T cells. **Nature Microbiology**, Nova York, v. 2, n. 6, p. 17036, 2017.

WESTAWAY, E. G. *et al.* Flaviviridae. **Intervirology**, Basel, v. 24, n. 4, p. 183–192, 1985.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Zika virus outbreaks in the Americas. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, Genebra, v. 90, n. 45, p. 609–610, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus**. Genebra, 2016a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Situation Report: Zika Virus Microcephaly and Guillain–Barré Syndrome**. Genebra: OMS, 2016b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)>. Genebra, 2016c.

WIELANEK, A. C. *et al.* Guillain-Barré syndrome complicating a Chikungunya virus infection. **Neurology**, Minneapolis, v. 69, n. 22, p. 2105–2107, 2007.

WINKLER, C. W. *et al.* Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. **The Journal of immunology**, Rockville, v. 198, n. 9, p. 3526–3535, 2017.

- WINKLER, G. *et al.* Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, Amsterdã, v. 162, n. 1, p. 187–196, 1988.
- WOLFE, N. D. *et al.* Sylvatic transmission of arboviruses among bornean orangutans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 64, n. 5, p. 310–316, 2001.
- WU, K. *et al.* Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell research**, Nova York, v. 26, n. 6, p. 645–654, 2016.
- WU, Y. *et al.* Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell discovery**, Nova York, v. 3, p. 17006, 2017.
- XIA, H. *et al.* An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature Communications**, Nova York, v. 9, n. 1, p. 414, 2018.
- XIE, X. *et al.* Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 8, p. 4609–4622, 2013.
- YAP, T. L. *et al.* Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **Journal of virology**, Washington, v. 81, n. 9, p. 4753–4765, 2007.
- YAUCH, L. E. *et al.* A protective role for dengue virus-specific CD8⁺ T cells. **The Journal of immunology**, Rockville, v. 182, n. 8, p. 4865–4873, 2009.
- YE, J. *et al.* Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. **Journal of virology**, Washington, v. 91, n. 8, p. e00039-17, 2017.
- YE, J. *et al.* Immune evasion strategies of flaviviruses. **Vaccine**, Amsterdã, v. 31, n. 3, p. 461–471, 2013.
- YE, Q. *et al.* Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdã, v. 43, p. 43–49, 2016.
- YOCKEY, L. J. *et al.* Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, Cambridge, v. 166, n. 5, p. 1247- 1256.e4, 2016.
- YOUNG, P. R. *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1053–1057, 2000.
- YU, I. *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, Washington, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 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, 2015a.
- ZAMMARCHI, L. *et al.* Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. **Eurosurveillance**, Estocolmo, v. 20, n. 23, p. 21153, 2015b.
- 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.

- ZEBOVITZ, E.; LEONG, J. K.; DOUGHTY, S. C. Involvement of the host cell nuclear envelope membranes in the replication of Japanese encephalitis virus. **Infection and immunity**, Washington, v. 10, n. 1, p. 204–211, 1974.
- ZHANG, F. *et al.* Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 44, n. 18, p. 8610–8620, 2016.
- ZHAO, B. *et al.* Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communications**, Nova York, v. 8, p. 14762, 2017.
- ZHAO, Z. *et al.* Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. **Journal of General Virology**, Londres, 2019.
- ZHOU, Y. *et al.* Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. **Journal of virology**, Washington, v. 81, n. 8, p. 3891–3903, 2007.
- ZHU, Z. *et al.* Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerging Microbes & Infections**, Londres, v. 5, n. 3, p. e22–e22, 2016.
- ZOU, J. *et al.* Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. **Journal of virology**, Washington, v. 89, n. 7, p. 3471–3483, 2015.

APÊNDICE A - PROTEÍNAS IMUNOPRECIPITADAS

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continua)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
1	Zika Virus NS5	NS5	54212333
2	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	ZC3H11A	1252800
3	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	DDX20	1133010
4	Importin-5	IPO5	987380
5	Gem-associated protein 4	GEMIN4	946653,3
6	Matrin-3	MATR3	757073,3
7	Coatomer subunit alpha	COPA	752706,7
8	Coatomer subunit gamma-1	COPG1	680256,7
9	Glycogen [starch] synthase, muscle	GYS1	644303,3
10	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	637203,3
11	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	LARS	545506,7
12	Importin-7	IPO7	542076,7
13	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	518776,7
14	Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	489666,7
15	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	HACD3	475750
16	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1	474006,7
17	Exosome complex exonuclease RRP44	DIS3	459170
18	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	EPRS	442653,3
19	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2	424363,3
20	Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	421296,7
21	Transmembrane protein 33	TMEM33	418203,3
22	60S ribosomal protein L29	RPL29	372227
23	Exportin-T	XPOT	362216,7
24	Structural maintenance of chromosomes protein 3	SMC3	361253,3

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
25	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	NSUN2	361196,7
26	Myb-binding protein 1A	MYBBP1A	359076,7
27	Histone H2A	H2AFV	339736,7
28	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	GART	330393,3
29	Pre-mRNA-processing factor 6	PRPF6	323983,3
30	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B	321110
31	Nucleolar protein 56	NOP56	306990
32	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	305763,3
33	X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6	302006,7
34	DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	298503,3
35	Importin-8	IPO8	296060
36	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	SNRPN	275036,7
37	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	268530
38	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR	265880
39	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	ZRANB2	260210
40	Nucleolar complex protein 2 homolog	NOC2L	257136,7
41	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2	243116,7
42	Nucleolar protein 58	NOP58	241810
43	60S ribosomal protein L31	RPL31	233817
44	ATP-dependent RNA helicase DDX18	DDX18	227996,7
45	DNA mismatch repair protein Msh6	MSH6	227006,7
46	N-acetyltransferase 10	NAT10	225040
47	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	EIF3D	217716,7
48	Importin-9	IPO9	216356,7

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
49	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	211640
50	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	DYNC1LI1	209823,3
51	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	HSD17B12	209516,7
52	Nucleolar GTP-binding protein 1	GTPBP4	209303,3
53	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	208763,3
54	ATP-binding cassette sub-family D member 3	ABCD3	205113,3
55	Lamin-B receptor	LBR	203706,7
56	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	199810
57	Exportin-7	XPO7	196560
58	ELAV-like protein 1	ELAVL1	181946,7
59	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	DPM1	174026,7
60	60S ribosomal protein L22	RPL22	171253,3
61	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	SMARCA5	169344
62	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	160003,3
63	26S protease regulatory subunit 6B	PSMC4	157543,3
64	Importin-4	IPO4	153796,7
65	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	153160
66	Pumilio homolog 1	PUM1	151596,7
67	Transportin-1	TNPO1	150196,7
68	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RSL1D1	147376,7
69	DNA mismatch repair protein Msh2	MSH2	145360
70	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	138660
71	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	136106,7

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
72	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	135553,3
73	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1	135197,3
74	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	USP10	134740
75	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	131353
76	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC2	131340
77	Serine/arginine-rich splicing factor 5	SRSF5	130316,7
78	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3	125830,7
79	Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3	125580,7
80	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I	124656,7
81	YTH domain-containing family protein 2	YTHDF2	120524,7
82	Pre-mRNA 3-end-processing factor FIP1	FIP1L1	118753,3
83	Condensin complex subunit 1	NCAPD2	118077,7
84	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	U2AF2	117993
85	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	PFKM	116742,7
86	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	115677,7
87	Lymphoid-specific helicase	HELLS	114966,3
88	Catenin delta-1	CTNND1	114450,7
89	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B	113804
90	DNA polymerase	POLD1	110800,7
91	40S ribosomal protein S5	RPS5	110683,3
92	Tubulin beta-4A chain	TUBB4A	110494
93	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	107636,7
94	SRSF protein kinase 2	SRPK2	106462
95	RNA-binding protein 4B	RBM4	105696,3
96	Anaphase-promoting complex subunit 7	ANAPC7	104363,3

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
97	Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	103033,3
98	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5	100731,3
99	Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	99742
100	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	DDX47	99391
101	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	EIF4G2	98850,33
102	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	EIF2S2	94860
103	Nuclear RNA export factor 1	NXF1	94043,33
104	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	PAF1	92159
105	Ribosomal biogenesis protein LAS1L	LAS1L	90882,33
106	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP	90122,67
107	Atypical kinase ADCK3, mitochondrial	ADCK3	89223,33
108	Dynein assembly factor 5, axonemal	DNAAF5	88147
109	Protein unc-45 homolog A	UNC45A	86969,33
110	60S ribosomal protein L36	RPL36	84170,33
111	Pyrroline-5-carboxylate reductase	PYCR1	83420
112	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	STAU1	82782
113	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	82600
114	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	TROVE2	81483,33
115	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	ZC3HAV1	81134,33
116	Signal recognition particle receptor subunit beta	SRPRB	80992
117	Histone H3	H3F3B	79471,67
118	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4	78958,67
119	Polyadenylate-binding protein	PABPC4	77561
120	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	DNAJA3	76530
121	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	ADAR	75615,33
122	Protein CIP2A	KIAA1524	75477

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
123	Unconventional myosin-Ib	MYO1B	74918,67
124	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F	74184,67
125	DnaJ homolog subfamily A member 2	DNAJA2	73628
126	pre-rRNA processing protein FTSJ3	FTSJ3	72687
127	MICOS complex subunit MIC60	IMMT	72199,33
128	Replication factor C subunit 5	RFC5	71944,67
129	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	HNRNPUL1	70253
130	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	MRPS34	69909,67
131	Synembryn-A	RIC8A	69393,33
132	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	AIMP2	68635,67
133	Galactokinase	GALK1	68560
134	NF-kappa-B-repressing factor	NKRF	68431,67
135	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	EEF1E1	66741,33
136	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	EDC4	66348,33
137	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A	65128,33
138	Putative RNA-binding protein 15	RBM15	64984,67
139	Leukocyte receptor cluster member 8	LENG8	63920,33
140	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	EIF3L	63690,67
141	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	63328,67
142	Cytoskeleton-associated protein 2	CKAP2	63073,67
143	Bystin	BYSL	62099,67
144	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma	EIF2B3	61916,67
145	EH domain-containing protein 4	EHD4	61420,67
146	Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	60291,67
147	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LRPPRC	59988

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
148	40S ribosomal protein S12	RPS12	59889,67
149	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLG2	57158,67
150	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	SAMHD1	56853,67
151	Fanconi anemia group I protein	FANCI	56622
152	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1BP3	53857,67
153	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	PTCD3	53226,67
154	ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1	52003
155	RNA polymerase-associated protein LEO1	LEO1	50278
156	THO complex subunit 4	ALYREF	49661,33
157	Regulatory-associated protein of mTOR	RPTOR	49293
158	FAS-associated factor 2	FAF2	48647,33
159	DNA helicase	MCM5	47225,33
160	AP-3 complex subunit delta-1	AP3D1	47119
161	Transportin-3	TNPO3	46005,33
162	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	45638
163	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	MTHFD1L	45338
164	Pescadillo homolog	PES1	45230,67
165	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB	44973,33
166	DDB1- and CUL4-associated factor 16	DCAF16	44624,67
167	C-terminal-binding protein 2	CTBP2	44210
168	Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	44189,67
169	Nuclear pore complex protein Nup205	NUP205	44052,33
170	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP	43130
171	Ig alpha-1 chain C region; Ig alpha-2 chain C region	IGHA1	42693,33

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
172	AP-3 complex subunit mu-1	AP3M1	42393,67
173	CTP synthase 2	CTPS2	40774,67
174	Fatty acid synthase	FASN	40573,33
175	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIMM50	39227,33
176	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	ZC3H18	39193,33
177	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	BRX1	38937
178	Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	38017,33
179	Serine/threonine-protein kinase 26	STK26	37273,33
180	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	DDX52	36009
181	Coatomer subunit gamma-2	COPG2	35359,33
182	Coatomer subunit beta	COPB2	35341,67
183	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	35163
184	Histone H1x	H1FX	35109,67
185	Threonine--tRNA ligase, mitochondrial	TARS2	34900,33
186	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A	34871,67
187	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	ALDH1B1	34805,33
188	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	34508
189	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	MMS19	34407,33
190	Nuclear pore complex protein Nup160	NUP160	34189
191	Nuclear pore complex protein Nup85	NUP85	33879,33
192	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A	RPRD1A	33864
193	Condensin-2 complex subunit G2	NCAPG2	33851,33
194	Transducin beta-like protein 3	TBL3	31207,33
195	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	DDX27	30858
196	Importin-11	IPO11	29336
197	28S ribosomal protein S23, mitochondrial	MRPS23	27552,33

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
198	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB	27461,67
199	V-type proton ATPase subunit H	ATP6V1H	26772,33
200	HCLS1-associated protein X-1	HAX1	25242,67
201	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	PDS5A	24432
202	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	23309
203	Cullin-4B	CUL4B	23087,33
204	28S ribosomal protein S2, mitochondrial	MRPS2	22876
205	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	UTP18	21613,67
206	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23	MED23	21292,67
207	Unconventional myosin-Ic	MYO1C	21041,5
208	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L	OXA1L	20090
209	Melanoma-associated antigen D1	MAGED1	19688,33
210	Casein kinase II subunit alpha 3	CSNK2A1	19351,33
211	Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1	POP1	16832
212	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	NDUFS2	16698,5
213	Protein disulfide-isomerase	P4HB	16203
214	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	SKIV2L2	15968,33
215	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	ZW10	15719
216	28S ribosomal protein S27, mitochondrial	MRPS27	15327
217	Dynamin-1-like protein	DNM1L	11707
218	Probable dimethyladenosine transferase	DIMT1	10420,67
219	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 2	CAND2	9961
220	WD repeat-containing protein 3	WDR3	9842,333
221	Exportin-5	XPO5	9172

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
222	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX49	DDX49	8937,667
223	AP-2 complex subunit alpha-1	AP2A1	8552
224	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	OPA1	8420,5
225	Methyltransferase-like protein 13	METTL13	6139,5
226	Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog	VPS51	5242,3
227	Long-chain fatty acid transport protein 4	SLC27A4	5157,5
228	Exportin-2	CSE1L	42,54278
229	Exportin-1	XPO1	32,33783
230	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	CAND1	22,67845
231	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	22,5471
232	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGL	22,37283
233	AP-3 complex subunit beta-1	AP3B1	21,44387
234	DNA replication licensing factor MCM4	MCM4	21,34112
235	Coatomer subunit beta	COPB1	20,46987
236	Glutamine--tRNA ligase	QARS	14,77169
237	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	MARS	14,32559
238	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	13,39473
239	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	13,28525
240	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	PFKL	12,70885
241	60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2	12,30401
242	Puromycin-sensitive aminopeptidase	NPEPPS	12,01158
243	Nuclear pore complex protein Nup93	NUP93	11,36462
244	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2	11,01797
245	Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	10,9029
246	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3	9,5302
247	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic;	MTHFD1	9,174921
248	Polyadenylate-binding protein	PABPC1	9,021567

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
249	60S ribosomal protein L4	RPL4	8,968879
250	Signal recognition particle subunit SRP72	SRP72	8,673784
251	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	ALDH18A1	8,567795
252	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	DARS	7,961736
253	Mitochondrial ribonuclease P protein 1	TRMT10C	7,868013
254	DNA replication licensing factor MCM6	MCM6	7,665922
255	Vesicle-fusing ATPase	NSF	7,629285
256	Emerin	EMD	7,588586
257	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	7,588027
258	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	7,577076
259	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13	7,095322
260	Nucleolin	NCL	6,873478
261	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	STT3A	6,872374
262	Importin subunit beta-1	KPNB1	6,864114
263	Serine/arginine-rich splicing factor 1	SRSF1	6,773167
264	Lysine--tRNA ligase	KARS	6,314225
265	Sideroflexin-1	SFXN1	6,235959
266	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	PUF60	6,042634
267	PHD finger protein 6	PHF6	5,977848
268	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	5,953466
269	Protein pelota homolog	PELO	5,931513
270	ATP-binding cassette sub-family F member 2	ABCF2	5,830856
271	60S ribosomal protein L6	RPL6	5,772105
272	26S protease regulatory subunit 8	PSMC5	5,655798
273	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	5,418964
274	Leucine-rich repeat-containing protein 40	LRRC40	5,390038
275	Insulin receptor substrate 4	IRS4	5,281516

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(continuação)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
276	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	SYNCRIP	5,244802
277	Interleukin enhancer-binding factor 2	ILF2	5,231802
278	60S ribosomal protein L7a	RPL7A	5,223966
279	26S protease regulatory subunit 7	PSMC2	5,030759
280	ADP/ATP translocase 1	SLC25A4	4,931081
281	RNA-binding motif protein, X chromosome	RBMX	4,847382
282	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	4,804664
283	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	4,774083
284	Erlin-2	ERLIN2	4,70234
285	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	SLC25A1	4,638265
286	Coatomer subunit delta	ARCN1	4,58835
287	Ataxin-10	ATXN10	4,588246
288	Transferrin receptor protein 1	TFRC	4,554257
289	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	4,529216
290	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	4,522677
291	Uridine 5-monophosphate synthase	UMPS	4,480765
292	AFG3-like protein 2	AFG3L2	4,473623
293	Torsin-1A-interacting protein 1	TOR1AIP1	4,44352
294	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1	4,358986
295	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	4,333162
296	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATP5C1	4,245227
297	60S ribosomal protein L18	RPL18	4,227113
298	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	SLC25A24	4,165565
299	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11	4,079607
300	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5	4,014394
301	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	SEC61A1	3,971278

Quadro 1. Proteínas Imunoprecipitadas.

(conclusão)

	Nome	Gene	Razão (NS5/Ctrl)
302	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	3,903059
303	40S ribosomal protein S8	RPS8	3,889356
304	60S ribosomal protein L10	RPL10	3,88447
305	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	3,799153
306	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	GRWD1	3,776997
307	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	3,715191
308	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	3,683531
309	DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	3,675999
310	60S ribosomal protein L7	RPL7	3,669081
311	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A	3,635834
312	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	SLC25A13	3,598717
313	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	AIMP1	3,59737
314	60S ribosomal protein L9	RPL9	3,548887
315	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB	3,541391
316	Prohibitin	PHB	3,541095
317	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	DHX30	3,526788
318	Replication factor C subunit 3	RFC3	3,492713
319	RuvB-like 1	RUVBL1	3,418209
320	Tubulin beta-6 chain	TUBB6	3,392282
321	60S ribosomal protein L12	RPL12	3,38797
322	rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	FBL	3,367195
323	60S ribosomal protein L3	RPL3	3,363387
324	CTP synthase 1	CTPS1	3,323163
325	Ribosomal protein L15	RPL15	3,290634
326	60S ribosomal protein L21	RPL21	3,168701
327	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	3,067246
329	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	3,047619

Fonte: Autor.

APÊNDICE B – ARTIGO ELABORADO

Caracterização do perfil da interação da proteína não-estrutural 5 (NS5) do vírus Zika em células embrionárias

Thais Melquiades de Lima¹, Gustavo Barbosa de Lima¹, Conceição Elidianne Anibal da Silva², Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti¹, Pedro Luiz Franca Neto³, Rafael Freitas de Oliveira Franca¹

1. Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brasil
2. Laboratório de Inflamação e Dor, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil
3. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Autor para correspondência: Rafael França, PE, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Instituto Aggeu Magalhaes, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brasil.

Telefone: (+55) (81)2101-2668; e-mail: rafael.franca@cpqam.fiocruz.br;

Resumo

O vírus Zika (ZIKV) é considerado um arbovírus emergente, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Foi recentemente introduzido no Brasil ocasionando uma doença viral aguda, além disso está associado ao aumento da ocorrência de complicações neurológicas e autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré, e a Síndrome Congênita do Zika. Conhecidamente, a proteína não-estrutural 5 desempenha importante papel na replicação do RNA viral e na inibição da resposta imune inata, além de apresentar-se de forma compartimentalizada no núcleo, seus mecanismos e interações ainda não estão totalmente compreendidos. Portanto, dá-se a devida importância em validar a investigação acerca da distribuição intracelular bem como a interação das proteínas virais em células infectadas, buscando assim entender os mecanismos replicativos do ZIKV e a compartimentalização da NS5. Inicialmente foi realizado a caracterização de plasmídeos expressando a proteína não-estrutural 5 nativa do vírus Zika, que foram transfectados em células embrionárias HEK293T, para observação da compartimentalização da NS5 por meio da imunofluorescência indireta. A identificação de potenciais proteínas que possam interagir com a NS5 do ZIKV foi realizada por imunoprecipitação dos complexos NS5/proteína-hospedeiro e análise por espectrometria de massas em busca da identificação do mapa peptídico. Foi observado que a localização

da proteína NS5 está presente na fração nuclear da célula, e que ela pode interagir com proteínas que estão envolvidas em processos biológicos, como processamento de mRNA, imunidade inata, ciclo celular, reparo do DNA e regulação da transcrição. Sendo assim, este trabalho revelou aspectos relacionados a função e localização desta proteína em células embrionárias.

Introdução

O vírus Zika é considerado um arbovírus emergente, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Apresenta semelhanças com outros membros do gênero, por possuir RNA genômico de cadeia simples positivo, que codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais, do capsídeo (C), precursora da membrana (prM) e do envelope (E), e em sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (KUNO et al., 1998; ACOSTA et al., 2014). Comumente, o ciclo de replicação dos vírus da família *Flaviviridae* ocorre exclusivamente no citoplasma celular (WESTAWAY et al., 1985). De fato, diversos achados da literatura relatam partículas virais maduras em sua maioria no lado externo da membrana nuclear, no aparelho de Golgi, dispersos como inclusão em todo o citoplasma, na superfície e nos espaços extracelulares de células infectadas (CARDIFF et al., 1973; CARDIFF; LUND, 1976; GOULD et al., 1985). No entanto, uma pequena proporção do ciclo replicativo dos vírus Oeste do Nilo, Dengue, vírus da encefalite Japonesa e do vírus Zika foi documentada apresentando-se de forma compartimentalizada no núcleo celular, tal achado se baseia na localização de complexos antigênicos da proteína não-estrutural 5 (NS5) no núcleo (BUCKLEY; GOULD, 1988; UCHIL et al., 2006; HERTZOG et al., 2018). Interessantemente, até o momento poucos estudos relataram a presença de antígenos virais específicos nos núcleos de células de vertebrados e invertebrados infectados com o vírus Zika (BUCKLEY; GOULD, 1988; PRYOR et al., 2007; KUMAR et al., 2013; HERTZOG et al., 2018), estes achados indicam que a localização nuclear e a compartimentalização da NS5 pode desempenhar um papel importante na regulação do processamento do gene nas células hospedeiras (HOU et al., 2017).

Como o maior componente proteico dentro do complexo de replicação do ZIKV, o NS5 desempenha papéis importantes no ciclo de vida e sobrevivência do vírus através dos seus domínios N-terminal metiltransferase (MTase) e C-terminal RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) (DUAN et al., 2017). Ainda possui sinais funcionais de localização nuclear (NLSs), que desempenham o papel principal na translocação nuclear

e na replicação de RNA viral (FORWOOD et al., 1999; JOHANSSON et al., 2001; BROOKS et al., 2002; PRYOR et al., 2007). Logo, é considerada uma enzima multifuncional que desempenha importante papel na replicação do RNA viral e na inibição da resposta imune inata. Nos seres humanos, ela antagoniza a resposta do interferon do tipo I (IFN), promovendo a degradação proteossomal do STAT2 (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Além da depleção de STAT2, bloqueando a fosforilação de STAT1 (HERTZOG et al., 2018).

Portanto, estudos que busquem esclarecer os mecanismos de replicação em células susceptíveis, sua distribuição intracelular bem como a interação das proteínas virais com proteínas dos hospedeiros, são importantes para a melhor compreensão da neuropatogênese das cepas de ZIKV nas atuais epidemias, além de contribuir para o desenvolvimento de potenciais estratégias antivirais destinadas a atenuar a infecção.

Material e Métodos

Células e Plasmídeos

As células renais embrionárias humanas HEK293T (ATCC; CLR-3216) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA) e cultivadas em garrafas T-75 a 3×10^6 células por garrafa em meio DMEM (Gibco™) suplementado com 10% de SFB e solução de antibiótico PEN/STREP (1%). Depois disso as células foram mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

Os plasmídeos NS5_eYFP contendo o gene NS5 da cepa NATAL RGN foram gentilmente fornecidos por Jan Rehwinkel e Jonny Hertzog, pesquisadores da Universidade de Oxford (10). Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH5a. Os clones selecionados foram rastreados por PCR de colônia, digestão com endonuclease de restrição e confirmados por sequenciamento de DNA por eletroforese capilar (Applied Biosystem 3500xL Genetic Analyzer).

Transfecção

As células HEK293T foram semeadas a uma densidade de 4×10^6 em garrafas de cultura T75. Após 24 h, foram transfectados com 20 µg de DNA plasmídial e 20 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) em meio Opti-MEM (Gibco), incubados por 24h a 37°C, 5% CO₂, após esse período houve a troca do meio de cultura para um completo com soro

e antibiótico. As células foram mantidas nas condições de incubação por 48h e 72h pós-transfecção, posteriormente foram lisadas e o extrato proteico obtido foi armazenado para análise de western blotting. Foi usada uma concentração de DNA recomendada pelo fabricante.

Extração e quantificação de proteínas

As células transfectadas foram coletadas após 48h de transfecção, e foram lisadas em tampão de lise RIPA contendo inibidores de Proteases e Fosfatases, e incubadas por 30min no gelo, após a lise as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C, e a fração sobrenadante foi coletada para ensaios de proteínas. As concentrações de proteína foram determinadas usando o ensaio de Bradford (Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland).

Fluorescência direta

Com o objetivo de analisar a compartimentalização e expressão da NS5 foi realizado ensaios de imunomarcação da proteína, o plasmídeo NS5-eYFP foi observado através da expressão da proteína fluorescente amarela (YFP) fusionada a NS5. Após 48h da transfecção as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4,0% (*Electron Microscopy Sciences*) por 15 minutos. Após fixação, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*®) a 0,1%, bloqueadas utilizando com 3% de BSA. Após etapas de lavagem com PBS, as lâminas foram montadas com ProLong Diamond Antifade Mountant com Dapi (Invitrogen™), este utilizado para corar o núcleo das células. As lâminas foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Leica DMI 4000 B.

Análise por Western blot

Um total de 40µg dos lisados foram separados por SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida a 10% (BIO-RAD, Hercules, Califórnia, U.S.A.) e as proteínas transferidas para membranas de PVDF em um sistema semi-dry de transferência (Semidry Tranfer Cell, BIORAD). O bloqueio foi realizado por 2 horas em agitação branda com tampão de bloqueio (5% leite desnatado em PBS+ 0,1% Tween 20) a temperatura ambiente. Anticorpo primário anti-V5 (Thermo Fisher, diluição 1:4000) foram diluídos em solução 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e incubados a overnight sob agitação branda. A membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos, seguida

por 1 hora de incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Anti-Mouse IgG (diluição 1:10000) diluído em tampão de bloqueio. Após uma série de lavagens as membranas foram reveladas no equipamento LAS 500.

Imunoprecipitação e espectrometria de massas

Após confirmado por Western blot a presença das proteínas nos lisados celulares, as mesmas foram imunoprecipitadas com o anticorpo V5 Tag (Thermo Fisher, R960-25) com de 25 μ L de esferas magnéticas de proteína G (Invitrogen). As proteínas imunoprecipitadas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 12%, o gel foi então corado com azul de Comassie Blue 250-R (staining) e depois descorado durante a noite com a solução descorante (metanol, ácido acético e água destilada). O conjunto de proteínas foi então excisado do gel e enviado em tubos de microcentrífuga com água destilada para a subunidade RPT02H - Espectrometria de Massas - PR no Instituto Carlos Chagas da Rede de Plataformas Tecnológicas/ Fiocruz.

Após os dados brutos resultantes do espectrômetro de massas, foi calculado por meio do Microsoft excel a razão do LFQ de massa da amostra teste (provenientes das imunoprecipitações dos lisados das células transfectadas) pela amostra controle (lisado das células não transfectadas). Então foi organizada uma lista com os peptídios mais abundantes, do maior para o menor, e foi adotado um score de razão acima de 3. Diante disso, esses dados foram analisados levando em consideração seus processos biológicos, localização e citações da literatura, o banco de dados de proteínas humanas utilizados foi o *UniProt*.

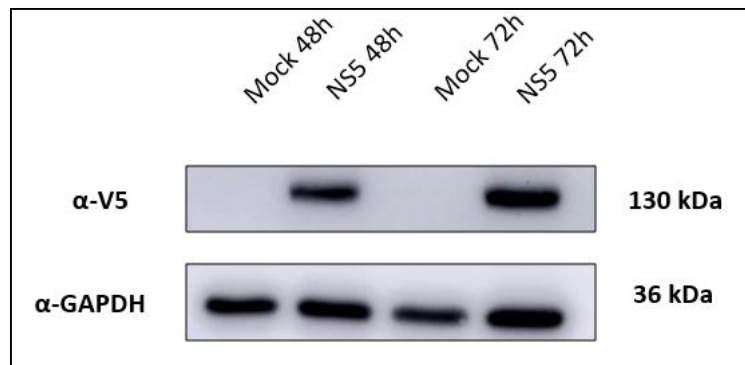
Resultados

Análise da expressão da proteína NS5

As amostras proteicas utilizadas foram de 40 μ g para cada grupo, assim, com quantidades totais idênticas. As células foram colhidas às 48 e 72 horas após a infecção e transfecção, respectivamente, para avaliação da expressão da NS5 em células HEK293T utilizando análises de Western blotting.

Os resultados mostraram a expressão da proteína NS5 do plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA, que contém a tag V5, nas 48h e 72h pós-transfecção em lisados celulares (**Figura 1**). Não houve expressão no mock em ambos os tempos.

Figura 1. Análise da expressão da proteína NS5 em células HEK293T transfectadas com plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

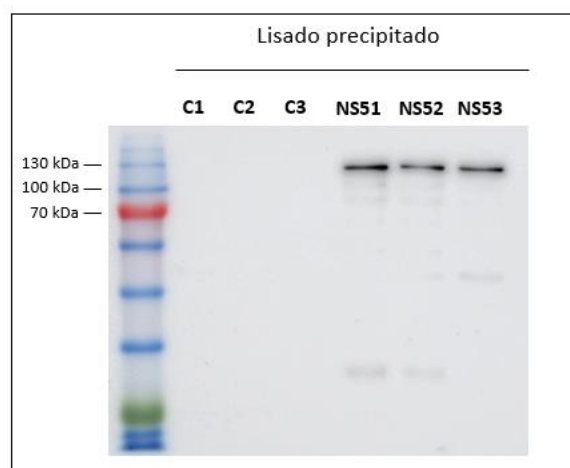


Legenda: Análise da expressão da proteína NS5, por western blot, em células HEK293T transfectadas com o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA. A normalização da intensidade das bandas foi realizada usando os níveis na proteína GAPDH como controle endógeno.

Imunoprecipitação dos complexos proteicos

Resultados prévios da expressão do plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA serviram para a continuidade dos experimentos, no qual foi realizada a imunoprecipitação (IP) com a finalidade de avaliar os possíveis parceiros funcionais. As amostras deste ensaio foram analisadas por *Western blot* e o resultado demonstrou que as proteínas detectadas no imunoprecipitado apresentaram os tamanhos esperados de aproximadamente 130 kDa para a proteína NS5, não sendo identificado no controle. Assim, os resultados confirmam a presença da proteína e com isso a eficácia do procedimento da imunoprecipitação como visto na **Figura 2**.

Figura 2. Análise da expressão da proteína NS5 em lisados celulares precipitados.

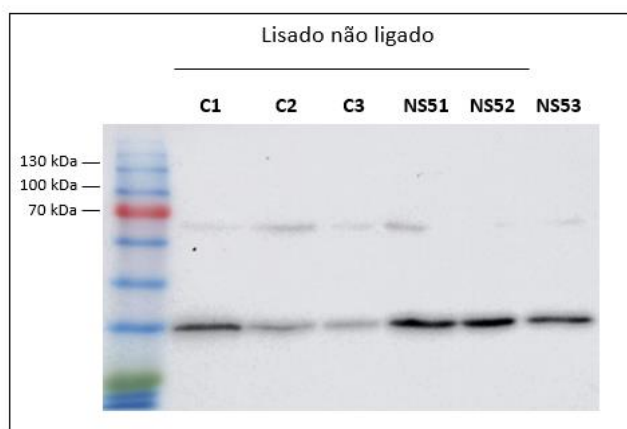


Legenda: Análise da expressão da proteína NS5, por western blot, dos lisados precipitados da imunoprecipitação das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

Já o lisado não ligado de todas as imunoprecipitações não apresentou bandas para a NS5, indicando que a totalidade das proteínas com a NS5 ficou aderida as esferas

magnéticas de proteína G, sendo detectado no western blot para o GAPDH, controle endógeno encontrado em todas as células (**Figura 3**).

Figura 3. Análise da expressão da proteína NS5 em lisados celulares precipitados.

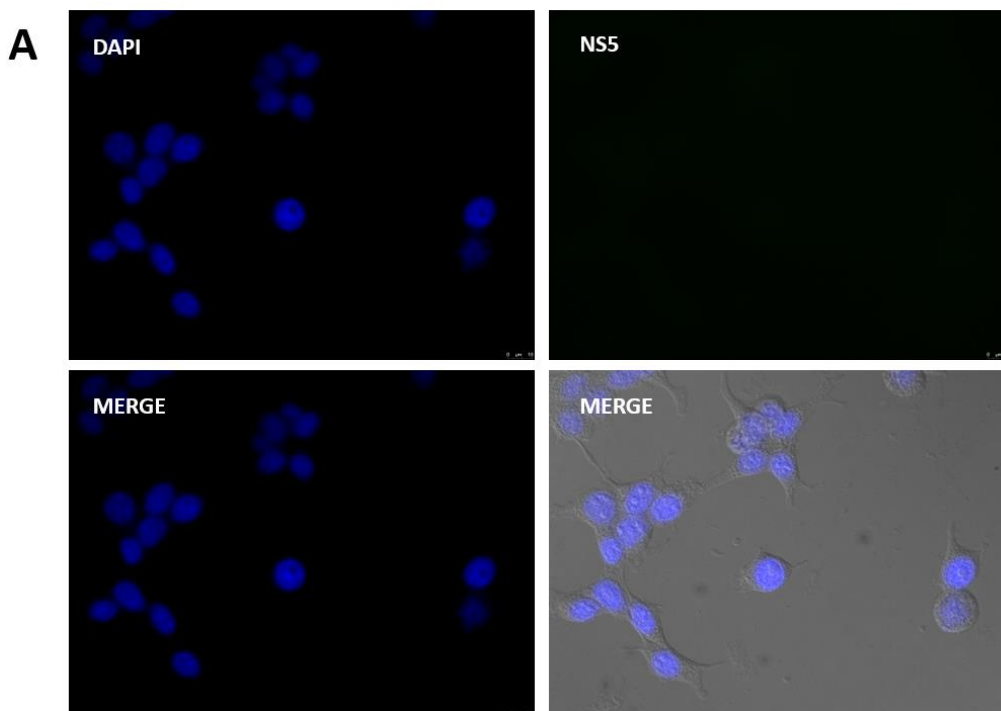


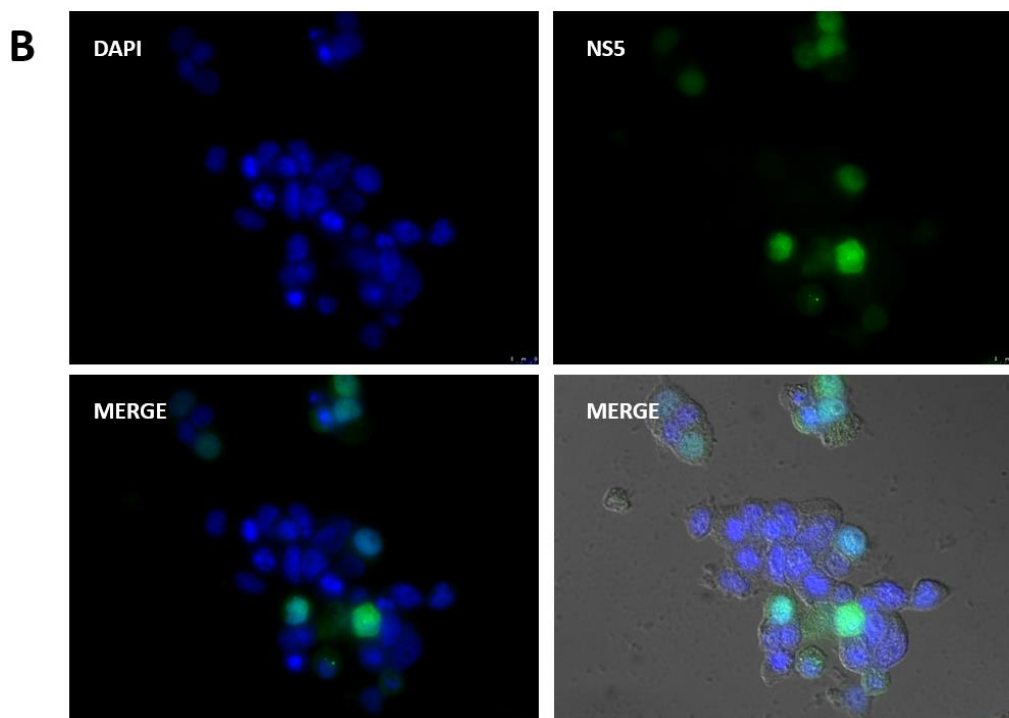
Legenda: Análise da expressão da proteína NS5, por western blot, dos lisados não ligados da imunoprecipitação das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA.

Imunofluorescência indireta em células HEK293T

A expressão do gene NS5 do ZIKV foi confirmada após 48h pós-transfecção, os resultados demonstram dessa maneira que a transfeccao nessa linhagem celular usando o vetor pCDNA foi eficiente, além disso, os resultados revelaram que estas proteínas foram expressas e localizadas no núcleo das células HEK293T transfectadas (**Figura 4**).

Figura 4. Imunofluorescência indireta em células HEK293T utilizando o plasmídeo pCDNA_NS5.





Legenda: (A) Imagens microscópicas de imunofluorescência em células HEK293T sem transfecção. (B) Imagens microscópicas de imunofluorescência em células HEK293T após o plasmídeo NS5-eYFP-pCDNA. As imagens foram tiradas 2 dias após a transfecção. NS5 (verde); DAPI (azul). A barra de escala = 10 μ m.

Espectrometria de massas

Dados da espectrometria de massas tidos como mais relevantes para processos biológicos de HEK293T estão resumidos na **Quadro 1** e levam em conta apenas as proteínas imunoprecipitadas com o NS5 e substancialmente enriquecidas em relação ao lisado celular utilizado como controle negativo nos experimentos de imunoprecipitação.

Foram selecionadas as 20 proteínas mais enriquecidas de acordo com a razão do LFQ das amostras transfectadas com o controle. Foi visto que a proteína NS5 foi a mais abundante dentre todos os peptídeos identificados, confirmando assim sua integridade após os processos de lise celular e imunoprecipitação.

Os dados revelaram que a proteína NS5 interage com proteínas já descritas como parceiras, como as proteínas de transporte nuclear importina, acredita-se que estas proteínas interagem diretamente com a NS5. Os resultados de espectrometria de massas revelaram outras proteínas potencialmente parceiras da NS5 e com possíveis implicações biológicas, como as que atuam no processamento e splicing do mRNA, na imunidade inata e na interação vírus-hospedeiro. Proteínas precipitadas envolvidas com processos celulares como ciclo celular, divisão celular, danos e reparo do DNA, ritmos biológicos, apoptose e regulação da transcrição, podem contribuir para o entendimento de

mecanismos patogênicos do vírus. Observa-se que a maioria das proteínas precipitadas estão localizadas no núcleo celular, mas também foi visto em outras regiões como citoplasma, Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndria.

Quadro 1. Proteínas imunoprecipitadas com a NS5 em células HEK293T.

	Identidade	Gene	Razão LFQ (NS5/Ctrl)	Processo biológico	Localização
1	Proteína não-estrutural 5 – Vírus Zika	NS5	54212333	Replicação RNA viral	Núcleo, citoplasma
2	Proteína da família <i>dedo de zinco CCCH 11^a</i>	ZC3H11A	1252800	Transporte de mRNA, Transporte	Núcleo
3	Provável RNA helicase DDX20 dependente de ATP	DDX20	1133010	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo, citoplasma
4	Importina 5	IPO5	987380	Interação vírus-hospedeiro, Transporte de proteínas	Núcleo, citoplasma
5	Proteína 4 associada à organela nuclear da gema	GEMIN4	946653,3	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo, citoplasma
6	Matrin 3	MATR3	757073,3	Imunidade inata	Núcleo
7	Subunidade alfa do coatômero	COPA	752706,7	Transporte ER-Golgi, Transporte de proteínas	Golgi, citoplasma
8	Subunidade gama 1 do coatômero	COPG1	680256,7	Transporte ER-Golgi, Transporte de proteínas	Golgi, citoplasma
9	Glicogênio sintase, músculo	GYS1	644303,3	Biossíntese de glicogênio	Citoplasma
10	Isoleucina - tRNA ligase citoplasmática	IARS	637203,3	Biossíntese de proteínas	Citoplasma
11	Leucina - RNAt ligase citoplasmática	LARS	545506,7	Biossíntese de proteínas	Citoplasma
12	Importina 7	IPO7	542076,7	Interação vírus-hospedeiro, Transporte de proteínas	Núcleo, citoplasma

13	<i>U5 Ribonucleoproteína nuclear pequena 116 kda</i>	EFTUD2	518776,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
14	Fator de splicing 3B subunidade 1	SF3B1	489666,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo
15	(3R) -3-hidroxiacil-CoA desidratase de cadeia muito longa 3	HACD3	475750	Biossíntese de ácidos graxos, Metabolismo de ácidos graxos, Biossíntese de lipídios, Metabolismo lipídico	Retículo endoplasmático
16	Fator 1 indutor de apoptose, mitocondrial	AIFM1	474006,7	Apoptose	Mitocôndria, núcleo, citoplasma
17	Exonuclease do complexo exossômico RRP44	DIS3	459170	Processamento rRNA	Núcleo, citoplasma
18	tRNA ligase - Glutamato bifuncional / prolina	EPRS	442653,3	Biossíntese de proteínas, Regulação da tradução	Citoplasma
19	Provável rRNA 28S (citosina (4447) -C (5)) - metiltransferase	NOP2	424363,3	Biogênese do ribossomo, Processamento de rRNA	Núcleo
20	Fator de splicing 3B subunidade 3	SF3B3	421296,7	Processamento mRNA, Splicing mRNA	Núcleo

Quadro 1: Quadro com os principais dados da espectrometria de massas, na qual é vista a identidade das proteínas co-imuprecipitadas com a NS5. Para saber a relação da abundância de peptídeos da amostra de interesse, é calculada a razão entre a amostra teste (células transfectadas NS5) e a amostra controle (célula sem está transfectada), que permite a análise da relação da média do LFQ entre os extratos derivados de células que expressam NS5 dividido pela média do LFQ observado nos lisados das células controle. Também é observado o processo biológico que a proteína está envolvida e sua localização subcelular através do UniProt database.

Discussão

O ZIKV é um arbovírus emergente e ganhou repercussão internacional nos últimos anos se tornando um dos flavivirus 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 e adultos atraiu a atenção global sobre a necessidade de estudar e compreender o mecanismo de patogênese viral. Apesar do enorme avanço no conhecimento a respeito do vírus, ainda se faz necessário estudar o tropismo e o impacto do ZIKV sobre a biologia celular e como esses fatores comprometem o desenvolvimento. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar possíveis interações entre a proteína viral NS5 e proteínas do hospedeiro, bem como sua distribuição intracelular, analisando, dessa maneira, potenciais mecanismos que explicassem a capacidade do vírus de replicação e inibição da resposta imune inata.

No presente estudo foi observado que a localização subcelular da proteína NS5 está presente na fração nuclear da célula, observado por imunofluorescência indireta. Este resultado corroborou com outros estudos que confirmam que o NS5 se localiza no núcleo durante a infecção viral e superexpressão da proteína, sendo observado em células Vero, HeLa, Huh-7, LN229, C6/36 e HEK293T que expressam o ZIKV NS5, assim sugere-se que a localização nuclear vinda do ZIKV NS5 é independente do tipo de célula (GRANT et al., 2016; HERTZOG et al., 2018; NG, IVAN H.W. et al., 2019; KOVANICH et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

Na espectrometria de massas, a proteína de maior razão no nosso estudo foi a proteína da família *dedo de zinco CCCH*, a ZC3H11A, proteína de ligação à RNA que modula a expressão gênica em eucariotos (BLACKSHEAR, 2002). A PAF1 também foi encontrada em imunoprecipitações da NS5 do vírus Zika e Encefalite japonesa (KOVANICH et al., 2019), sendo considerado um alvo celular conservado da NS5 em flavivirus, este gene é responsável pela codificação da subunidade do complexo fator associado à polimerase (PAF1). Este complexo PAF1 interage com a RNA polimerase II e desempenha um papel no alongamento da transcrição, bem como nas modificações das histonas, incluindo ubiquitilação e metilação (CHEN et al., 2015).

Além disso, foi realizada a comparação do nosso conjunto de dados com dados de interação ZIKV-hospedeiro da literatura e foi observado 12 proteínas sobrepostas, que incluem HNRNPC, HNRNPH3, LEO1, MATR3, NOC2L, PAF1, RBMX, SF3B1, SF3B3, THRAP3, ZC3H18 e ZRANB2 (COYAUD et al., 2018; SHAH et al., 2018). Notou-se também a presença de proteínas que são comuns em interações de NS5 de outros flavivirus, como CSE1L, EIF3A,

EIF3B, EIF3C, EIF3L, HNRNPA0, HNRNPA3, LEO1, MATR3, NOC2L, RUVBL1, SRSF7 e ZRANB2 (SAVIDIS et al., 2016; MAIO et al., 2016; KOVANICH et al., 2019).

A literatura demonstra que a proteína NS5 possui como alvo principal as proteínas hospedeiras envolvidas na síntese, processamento e transporte de RNA (BRETON, LE et al., 2011; MAIO et al., 2016; COYAUD et al., 2018; SHAH et al., 2018). Como esperado, nossa pesquisa revelou proteínas de processamento e splicing do mRNA, como DDX18, DDX20, EFTUD2, GEMIN4, HNRNPA3, PRPF6, SF3B1, SF3B3, SNRPN, proteínas de transporte nuclear como IPO5, IPO7, IPO8, IPO9 e XPOT, e várias enzimas metabólicas, GYS1, HACD3 e TECR. Proteínas celulares de funções conhecidas mas que não possuem associação direta com a NS5 na literatura foi observada, como IGHA1, proteína da região constante das cadeias pesadas de imunoglobulina (SCHROEDER; CAVACINI, 2010); TMEM33, que regula positivamente a sinalização de resposta de proteína desdobrada mediada por PERK e mediada por IRE1 (SAKABE et al., 2015); e a XRCC6 que desempenha um papel na regulação da resposta imune inata mediada por vírus de DNA, e ainda serve de plataforma para a fosforilação do IRF3 e a subsequente ativação da resposta imune inata pela via cGAS-STING (MORCHIKH et al., 2017).

Na literatura, os interactomas da NS5 foram investigados por vários tipos de ensaios, por hibridação dupla de levedura de alto rendimento (Y2H) e identificação de biotina dependente de proximidade em larga escala (BioID) como por sistemas de superexpressão ou em células infectadas, o que poderia explicar parcialmente diferenças entre os trabalhos. Outras pequenas diferenças nos métodos, como vetores de expressão, marcadores de afinidade, diferenças na sequência de aminoácidos entre as cepas de vírus utilizadas, também podem contribuir para as diferenças entre os estudos.

Deve-se levar em conta que este trabalho descreve interações que ocorrem através da superexpressão da NS5 e que não leva em conta algumas interações proteína-vírus-hospedeiro que só podem ser observadas no contexto de uma infecção viral. Por fim, o aumento da compreensão da rede de interação vírus-hospedeiro no nível molecular trará novas ideias para inibição e controle viral.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Jan Rehwinkel e Dr. Jonny Hertzog, pesquisadores da Universidade de Oxford por fornecer o vetor NS5-eYFP. Também agradecemos à equipe do IAM pela assistência técnica.

Financiamento

Este estudo foi financiado financeiramente pelo Projeto Zika Fast Track, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e também agradecemos à CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

1. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Cropp CB, Kuno G, Chang GJ, et al. Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J Virol*. 1998;72(1):73–83.
2. Acosta EG, Kumar A, Bartenschlager R. Revisiting Dengue Virus–Host Cell Interaction. In: *Advances in virus research*. 2014. p. 1–109.
3. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SYa, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L, et al. Flaviviridae. *Intervirology*. 1985;24(4):183–92.
4. Gould EA, Buckley A, Cammack N, Barrett ADT, Clegg JCS, Ishak R, et al. Examination of the Immunological Relationships between Flaviviruses Using Yellow Fever Virus Monoclonal Antibodies. *J Gen Virol*. 1985 Jul 1;66(7):1369–82.
5. Cardiff RD, Lund JK. Distribution of dengue-2 antigens by electron immunocytochemistry. *Infect Immun*. 1976 Jun;13(6):1699–709.
6. Cardiff RD, Dalrymple JM, Russell PK. RNA polymerase in group B arbovirus (dengue-2) infected cells. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1973;40(3–4):392–6.
7. Uchil PD, Kumar AVA, Satchidanandam V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol*. 2006 Jun 1;80(11):5451–64.
8. Hertzog J, Dias Junior AG, Rigby RE, Donald CL, Mayer A, Sezgin E, 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. *Eur J Immunol*. 2018;48(7):1120–36.
9. Buckley A, Gould EA. Detection of Virus-specific Antigen in the Nuclei or Nucleoli of Cells Infected with Zika or Langkat Virus. *J Gen Virol*. 1988 Aug 1;69(8):1913–20.
10. Pryor MJ, Rawlinson SM, Butcher RE, Barton CL, Waterhouse TA, Vasudevan SG, et al. Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Through Its Importin α/β -Recognized Nuclear Localization Sequences is Integral to Viral Infection. *Traffic*. 2007 Jul 1;8(7):795–807.
11. Kumar A, Bühler S, Selisko B, Davidson A, Mulder K, Canard B, et al. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling. *J Virol*. 2013 Apr;87(8):4545–57.

12. Hou W, Cruz-Cosme R, Armstrong N, Obwolo LA, Wen F, Hu W, et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene*. 2017 Sep 10;628:117–28.
13. Duan W, Song H, Wang H, Chai Y, Su C, Qi J, et al. The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. *EMBO J*. 2017;36(7):919–33.
14. Brooks AJ, Johansson M, John A V, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36399–407.
15. Forwood JK, Brooks A, Briggs LJ, Xiao C-Y, Jans DA, Vasudevan SG. The 37-Amino-Acid Interdomain of Dengue Virus NS5 Protein Contains a Functional NLS and Inhibitory CK2 Site. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 21;257(3):731–7.
16. Johansson M, Jans DA, Vasudevan SG, Brooks AJ. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol* [Internet]. 2001 Apr 1;82(4):735–45.
17. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe*. 2016 Jun 8;19(6):882–90.
18. Kumar A, Hou S, Airo AM, Limonta D, Mancinelli V, Branton W, et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep*. 2016 Dec 1;17(12):1766–75.
19. Kovanich D, Saisawang C, Sittipaisankul P, Ramphan S, Kalpongkukul N, Somparn P, et al. Analysis of the Zika and Japanese Encephalitis Virus NS5 Interactomes. *J Proteome Res* [Internet]. 2019 Aug 2;18(8):3203–18.
20. Zhao Z, Tao M, Han W, Fan Z, Imran M, Cao S, et al. Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *J Gen Virol*. 2019 Dec 20.
21. Ng IHW, Chan KWK, Tan MJA, Gwee CP, Smith KM, Jeffress SJ, et al. Zika Virus NS5 Forms Supramolecular Nuclear Bodies That Sequester Importin- α and Modulate the Host Immune and Pro-Inflammatory Response in Neuronal Cells. *ACS Infect Dis*. 2019 Jun 14;5(6):932–48.
22. Blackshear PJ. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. In: *Biochemical Society Transactions*. 2002. p. 945–52.

23. Chen FX, Woodfin AR, Gardini A, Rickels RA, Marshall SA, Smith ER, et al. PAF1, a Molecular Regulator of Promoter-Proximal Pausing by RNA Polymerase II. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):1003–15.
24. Coyaud E, Ranadheera C, Cheng D, Gonçalves J, Dyakov BJA, Laurent EMN, et al. Global interactomics uncovers extensive organellar targeting by Zika Virus. *Mol Cell Proteomics*. 2018 Nov 1;17(11):2242–55.
25. Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, et al. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell*. 2018 Dec 13;175(7):1931-1945.e18.
26. Savidis G, McDougall WM, Meraner P, Perreira JM, Portmann JM, Trincucci G, et al. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep*. 2016 Jun 28;16(1):232–46.
27. De Maio FA, Risso G, Iglesias NG, Shah P, Pozzi B, Gebhard LG, et al. The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. Pierson TC, editor. *PLOS Pathog* . 2016 Aug 30;12(8):e1005841.
28. Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, de Lamballerie X, et al. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol*. 2011 Oct 20;11(1):234.
29. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125.
30. Sakabe I, Hu R, Jin L, Clarke R, Kasid UN. TMEM33: a new stress-inducible endoplasmic reticulum transmembrane protein and modulator of the unfolded protein response signaling. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Sep 7;153(2):285–97.
31. Morchikh M, Cribier A, Raffel R, Amraoui S, Cau J, Severac D, et al. HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. *Mol Cell*. 2017 Aug 3;67(3):387-399.e5.