UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E
BIOAGENTES PATOGÊNICOS

ROBERTA MARANINCHI SILVEIRA

Localização subcelular do vírus da Zika durante a infecção em células humanas

Ribeirão Preto, SP

2018

ROBERTA MARANINCHI SILVEIRA

Localização subcelular do vírus da Zika durante a infecção em células humanas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva

Ribeirão Preto, SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silveira, Roberta Maraninchi

Localização subcelular do vírus da Zika durante a infecção em células humanas. Ribeirão Preto, 2018.

69 p :il 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Lamberti Pinto da Silva, Luis.

1.ZIKV. 2.ESCRT. 3.TSG101. 4.Flavivírus. 5.Calnexina 6.TGN46. 7.Célula U251

Nome: SILVEIRA, Roberta Maraninchi

Título: Localização subcelular do vírus da Zika durante a infecção em células humanas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Ricardo e Stela e
às minhas irmãs, Luciana e
Renata, pelo carinho, pelo apoio
e pelo amor incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de São Paulo e ao departamento de Biologia Celular e Molecular, por concederem a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Às instituições FAPESP, CNPq, CAPES e FAEPA, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial à FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (Nº de processo: 2016/05945-1), muito obrigada.

Ao meu orientador, Luis Lamberti, por todos os ensinamentos, que ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por toda a paciência, pela compreensão quando precisei e pelo grande apoio e incentivo constantes. Sou muito grata pela grande oportunidade de ter trabalhado com você.

Ao professor Dr. Eurico Arruda (Laboratório de Patogênese Viral - FMRP/USP), por disponibilizar o laboratório para realização de parte dos experimentos desse trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (Laboratório de Virologia Molecular - FMRP/USP), por ceder o anticorpo contra o Zika Vírus utilizado nesse trabalho.

Aos professores da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, por todos os ensinamentos compartilhados.

Ao todos os funcionários, técnicos e alunos do departamento de Biologia Celular e Molecular, pela contribuição direta ou indireta com este trabalho. Às secretárias Gabriela e Camila, pela paciência e grande ajuda ao longo desse período.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal deste departamento e às técnicas Elizabete (Bete) e Roberta, pela ajuda fornecida para obtenção e análise das minhas imagens.

Ao grupo do Laboratório de Tráfego Intracelular de Proteínas: Julianne, Érika, Lucas, Estela, Cristina, Juan, Leonardo, Natália, Yunan, Mara e Andréia. Muito obrigada por todo apoio e incentivo, pela ajuda, pela paciência, pelas descontrações e acolhimento durante esses dois anos.

Ao Marcos Salles, pela grande ajuda, ensinamentos, paciência e incentivo nos experimentos finais desse trabalho. Muito obrigada.

Às minhas amigas de Pelotas, Kaka, Paulinha, Pathi, Gabe, Déia e Marina que apesar de estarem longe, sempre estivemos juntas de coração, obrigada pelas conversas descontraídas, conselhos e obrigada pela nossa grande amizade, amo vocês!

Á minha família, meu pai Ricardo Silveira, minha mãe Stela Maraninchi, e minhas irmãs, Luciana e Renata, pela ajuda e apoio nas alegrias e nas horas mais difíceis, e por representarem a base de tudo o que sou hoje. Amo muito vocês!!!

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo, Johnny, pelo enorme apoio, incentivo, ajudas constantes, pelos conselhos e pela compreensão, te amo muito!

RESUMO

SILVEIRA, R. M. Localização subcelular do vírus da Zika durante a infecção em células humanas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O vírus da Zika (ZIKV) é um arbovírus emergente da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* transmitido por mosquitos *Aedes*. Apesar da sua importância emergente na saúde pública, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos no ciclo replicativo do ZIKV em células humanas. Assim, o objetivo geral deste estudo foi caracterizar a distribuição subcelular do ZIKV na célula hospedeira e elucidar fatores celulares que regulam o tráfego intracelular de proteínas envolvidos nesses processos. Mais especificamente, determinar os compartimentos celulares que servem de plataforma de montagem para o ZIKV. Além disso, também verificar se o funcionamento da maquinaria *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT) é requerido no ciclo replicativo de ZIKV. Para identificar a localização subcelular do ZIKV, foram utilizados diferentes marcadores celulares, e, de acordo com os resultados, foi demonstrado que com 3 horas pós infecção (h. p. i.) ocorre colocalização de proteínas do ZIKV com um marcador de endossomo primário, enquanto que com 15h p.i. já é possível detectar proteínas virais no Retículo Endoplasmático (RE). Subsequentemente, com 27h p.i. o ZIKV direciona-se para o complexo de Golgi. Juntos, esses resultados indicam o direcionamento do ZIKV através da via secretória ao longo do tempo. Além disso, foi testado o envolvimento da maquinaria dos ESCRTs por meio do silenciamento da expressão da proteína TSG101 de ESCRT-I em células infectadas com ZIKV. Os resultados obtidos, sugerem que ESCRT-I tem participação importante na replicação do ZIKV, ocorrendo a diminuição dos títulos virais quando TSG101 é depletada da célula. Em conjunto, os resultados permitem concluir que ao longo da infecção o ZIKV encontra-se associado aos compartimentos da via secretória inicial (RE e complexo de Golgi), e que a proteína TSG101 de ESCRT-I exerce papel importante na replicação viral. Sendo assim, esse estudo possibilitou um melhor entendimento sobre a dinâmica de replicação do ZIKV em células humanas.

Palavras-chave: ZIKV; ESCRT; TSG101; Flavivírus; Calnexina; TGN46; Célula U251

ABSTRACT

SILVEIRA, R. M. Subcellular localization of Zika virus during infection in human cells. (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus of the *Flaviviridae* family, of the genus *Flavivirus* that is transmitted by *Aedes* mosquitoes. Despite its emerging importance in public health, little is known about the molecular mechanisms involved in the replicative cycle of ZIKV in human cells. Thus, the general objective of this study was to characterize the subcellular distribution of the ZIKV in the host cell and to elucidate cellular factors that regulate the intracellular trafficking of proteins involved in these processes. More specifically, to determine the cellular compartments that serve as assembly platforms for the ZIKV. In addition, the study aimed to verify if the functioning of the *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT) machinery is required in the replicative cycle of ZIKV. In order to identify the subcellular localization of ZIKV, different intracellular markers were used, and, according to the results, it was demonstrated that at 3 hours post infection (h. p. i.) ZIKV proteins colocalize with an early endosome marker, whereas within 15h p.i. it is already possible to detect newly-synthesized viral proteins in the endoplasmic reticulum (ER). Subsequently, within 27h p.i., the ZIKV is directed to the Golgi complex. Together, these results delineate the targeting of ZIKV proteins through the secretory pathway over time. In addition, the involvement of the ESCRT machinery was tested by knocking down the expression of ESCRT-I protein TSG101 in ZIKV-infected cells. The results obtained suggest that ESCRT-I plays an important role in ZIKV replication, with viral titers decreasing when TSG101 levels are depleted in the cell. Together, the results allow us to conclude that ZIKV is associated with the initial secretory pathways (RE and Golgi complex) throughout the infection, and that the ESCRT-I TSG101 protein plays an important role in viral replication. Thus, this study contributes to a better understanding of the dynamics of ZIKV replication in human cells.

Key words: ZIKV; ESCRT; TSG101; Flavivirus; Calnexine; TGN46; U251 cell

LISTA DE ABREVIATURAS

ZIKV – Zika Vírus

JEV – *Japanese Encephalitis vírus*

DENV – *Dengue vírus*

YE – *Yellow Fever*

WNV – *West Nile virus*

SLEV – *Saint Louis Encephalitis virus*

RNA_m – RNA mensageiro

RE – Retículo Endoplasmático

ESCRT - *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

TGN: trans-Golgi *network*, rede trans-Golgi

M.O.I. – *Multiplicity of Infection*

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio

HRP – *horseradish peroxidase*

P.I. – pós-infecção

VILs – Vesículas Intraluminais

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

WHO – *World Health Organization*

VPS - *Vacuolar Protein Sorting*

PBS - *phosphate buffered saline*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquemas da estrutura e RNA genômico dos flavivírus.....	25
Figura 2 – Ciclo replicativo dos flavivírus	26
Figura 3 - Esquema demonstrando o funcionamento da maquinaria ESCRT na membrana de endossomos.....	29
Figura 4 - Screening de células infectadas por ZIKV.....	43
Figura 5 – Curva de Replicação viral ZIKV do lisado celular.....	44
Figura 6 – Cinética do ZIKV.....	45
Figura 7 - Marcação do endossomo primário (<i>Early Endosome Antigen 1</i> – EEA1).....	47
Figura 8 – Marcação do endossomo primário (Sortinexina-2 – SNX-2).....	49
Figura 9 - Marcação do endossomo tardio (CD63)	50
Figura 10 - Marcação de lisossomo – <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> (LAMP-1).....	51
Figura 11 – O ZIKV localiza-se no RE 15h p.i. (calnexina – CNX).....	53
Figura 12 – Marcação do complexo de Golgi (trans-Golgi <i>Network</i> – TGN-46).....	54
Figura 13 – Teste de eficiência de duas diferentes sequências de siRNA para o silenciamento de TSG101 em células U251.....	55
Figura 14 – O silenciamento de TSG101 em células U251 parece afetar a replicação viral.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise quantitativa da colocalização entre sinais da proteína E (ZIKV) e EEA1.....	48
TABELA 2 - Análise quantitativa da colocalização entre sinais ZIKV e CNX.....	53
TABELA 3 - Análise quantitativa da colocalização entre sinais ZIKV e TGN46.....	55

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. O vírus da Zika.....	21
2.2. Manifestações clínicas.....	21
2.3. Transmissão.....	22
2.4. Epidemiologia.....	23
2.5. Características estruturais e ciclo replicativo dos flavivírus.....	24
2.6. A maquinaria ESCRT.....	27
2.7. A maquinaria ESCRT e os flavivírus.....	29
3. OBJETIVO.....	31
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Linhagens celulares.....	34
4.2. Estabelecimento do estoque de ZIKV.....	34
4.3. Experimento de infecção de células com ZIKV.....	35
4.4. Curva de replicação do ZIKV.....	35
4.5. Ensaio de placa para a titulação viral.....	36
4.6. Silenciamento de TSG101 em células U251.....	37
4.7. Imunofluorescência e Microscopia confocal.....	37
4.8. Anticorpos utilizados para Imunofluorescência indireta.....	38
4.9. Anticorpos utilizados para <i>Western Blot</i>	38
4.10. Extração de Proteínas e Western Blot.....	39
4.10.1. Extração de proteínas.....	39

4.10.2. SDS-PAGE e eletrotransferência.....	40
4.10.3. Imunodeteção em membrana de nitrocelulose.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1 . Células de glioblastoma humano são susceptíveis à infecção por ZIKV.....	43
5.2 . Curva de replicação viral do ZIKV.....	44
5.3 . Distribuição intracelular do ZIKV ao longo do ciclo replicativo.....	45
5.4 . O ZIKV entra no citosol da célula hospedeira a partir de endossomos primários contendo o marcador EEA1.....	46
5.5 O RE e o complexo de Golgi são prováveis sítios de montagem de partículas do ZIKV em células de glioblastoma.....	52
5.6 . Silenciamento da proteína TSG101 de ESCRT-I em células infectadas com ZIKV.....	55
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	62
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 64

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O vírus da Zika (ZIKV) é um arbovírus emergente da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. Os flavivírus são responsáveis por um número considerável de morbidade e mortalidade ao redor do mundo (Kelvin et al, 2016). Dentre os flavivírus mais conhecidos estão os quatro sorotipos de vírus da Dengue (DENV), Oeste do Nilo (WNV), Febre Amarela (YF), Encefalite Japonesa (JEV), Encefalite de *Saint Louis* (SLEV) e ZIKV (Lindenbach et al., 2007; Pierson & Diamond 2012).

A infecção por flavivírus tem aumentado drasticamente no mundo nas recentes décadas em regiões de clima tropical e sub-tropical, acometendo milhares de indivíduos a cada ano. A epidemia do ZIKV tornou-se uma emergência de saúde pública nos últimos anos (Silva et al, 2017). Estudos recentes mostraram que a infecção por ZIKV afeta o sistema nervoso central (SNC), causando malformações fetais e certas neuropatias como a síndrome de *Guillain-Barré* (Ioos et al, 2014; Sarno et al, 2016). O vírus é principalmente transmitido através de mosquitos de espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, durante o seu repasso sanguíneo (Ahmed & Memish, 2017; Lopes et al, 2016). Esses dois insetos são também vetores de outras arboviroses e são amplamente encontrados no território brasileiro. Além disso, existem outras formas de transmissão reportadas para o ZIKV como perinatal através da placenta e contato sexual (Musso et al, 2014).

Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 10.867 casos foram notificados e estão distribuídos por quase todo o Brasil (Registro de Eventos de Saúde Pública - RESP 2016). Juntamente com outras epidemias recentes de DENV e Chikungunya (CHIKV), que também são transmitidos por mosquitos *Aedes*, o surgimento das infecções por ZIKV no Brasil gerou uma maior comoção social e cuidados para evitar a proliferação do mosquito (Ali et al, 2017). Embora se estime que a maioria dos pacientes não apresentem sintomas (Musso et al, 2014), existem relatos de que os indivíduos diagnosticados com infecção pelo ZIKV, podem apresentar, febre, dores de cabeça, tontura, dores retro orbitais, além de erupção cutânea maculopapular (Duffy et al, 2009; Heang et al, 2012).

Apesar da grande quantidade de casos e da sua importância na saúde pública brasileira, pouco se sabe sobre o ciclo replicativo do ZIKV na célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, o ZIKV é capaz de utilizar fatores celulares para produzir novas partículas virais (Hamel et al, 2015; Shi & Gao, 2017). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa utilização ainda são pouco conhecidos.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O vírus da Zika

O vírus da Zika (ZIKV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. O gênero *Flavivirus* inclui outros vírus como: vírus da Dengue (DENV), Oeste do Nilo (WNV), Febre Amarela (YF), Encefalite Japonesa (JEV) e Encefalite de *Saint Louis* (SLEV) (Lindenbach et al., 2007). Sendo as flaviviroses o grupo mais importante, em saúde pública, entre as arboviroses (Weaver & Reisen, 2010). Ainda, dentro do gênero *Flavivirus*, os vírus são subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, ou também em grupos com base em filogenia molecular (Mukhopadhyay et al, 2005).

O primeiro isolado do ZIKV foi obtido em 1947 em pesquisas com macacos *rhesus* utilizados como sentinelas, habitantes da Floresta de Zika, na Uganda, no leste da África (Marchette et al, 1969). A primeira infecção humana foi reportada também na Uganda, um pouco mais tarde, entre 1952 e 1964 (Simpson, 1964; Smithburn, 1952). Nas décadas seguintes, até meados de 2007, casos de infecção humana por ZIKV apresentaram-se na forma de surtos esporádicos (Duffy et al, 2009). No ano de 2007, uma grande epidemia foi reportada na Ilhas Yap, um território dos Estados Federados da Micronésia, com aproximadamente 75% da população sendo infectada pelo vírus, resultando assim, em uma drástica mudança na perspectiva da infecção pelo ZIKV (Hamel et al, 2016). Outros dados relatam surtos de infecção pelo ZIKV na Polinésia Francesa, e vários outros casos de ZIKV na Nova Caledônia, Ilha de Páscoa, e Ilhas Cook, indicando um rápido espalhamento do vírus na região do Pacífico (Musso et al, 2014). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que o ZIKV tenha chegado em meados de 2015 causando um grande surto de infecções, principalmente na região do Nordeste onde registrou-se diversos casos de microcefalia em recém-nascidos.

2.2. Manifestações clínicas

Como muitas outras infecções arbovirais, uma proporção substancial das infecções por ZIKV são subclínicas e assintomáticas. A doença causada pela infecção por ZIKV é geralmente leve e não requer nenhum tratamento médico especializado ou hospitalização

(Li & Li, 2016), estimando-se que 80% dos pacientes sejam assintomáticos (Musso et al, 2014). No entanto, os sintomas mais comuns incluem febre, mal-estar, dores de cabeça, tontura, anorexia, dores retro orbitais, mialgia, erupção cutânea maculopapular (Duffy et al, 2009; Heang et al, 2012). Os indivíduos infectados geralmente se recuperam em uma semana (Li & Li, 2016). Antes das recentes epidemias, não foram relatadas doenças graves, como a febre hemorrágica ou a morte, causadas por ZIKV. Além disso, a síndrome de *Guillain-Barré* e outras condições neurológicas, incluindo meningite, meningoencefalite e mielite, também foram observadas em surtos recentes na região do Pacífico (Oehler et al, 2014). Além disso, há estudos indicando que a infecção pelo ZIKV em mulheres grávidas pode afetar o desenvolvimento cerebral do feto causando microcefalia que leva ao grave comprometimento de funções motoras, visuais, auditivas e cognitivas (Oehler et al, 2014; Ramalho et al, 2017)

As infecções por ZIKV no Brasil a partir de 2015 foram correlacionadas com um aumento na incidência de microcefalia, uma condição neurológica rara ao nascimento (Mlakar et al, 2016). Segundo a definição da WHO (*World Health Organization*), essa condição neurológica causa problemas no crescimento normal da cabeça do recém-nascido ou do feto, e esse problema ocorre principalmente na região frontal occipital da cabeça (Schulz et al, 2018). Além disso, o tamanho do cérebro, que é significativamente menor daquele na faixa normal, é um fator de risco importante para o atraso cognitivo e motor (Harris, 2013). Crianças com microcefalia geralmente apresentam problemas de desenvolvimento e precisam de suporte vitalício. A partir de janeiro de 2016, o Ministério da Saúde do Brasil reportou um total de 3.530 casos de microcefalia, incluindo 46 óbitos.

2.3. Transmissão

A principal forma de transmissão do ZIKV se dá pelo mosquito vetor *Aedes aegypti*, durante o seu repasto sanguíneo no indivíduo. Esse mosquito é o mesmo que transmite DENV, CHIKV, entre outros vírus causadores de doenças (Duarte et al, 2017; Musso et al, 2015). Por isso, é necessário combater a proliferação desses mosquitos para que se tenha controle dessas doenças. Embora a principal forma de transmissão do ZIKV seja através do mosquito *Aedes*, foram relatadas outras formas de transmissão como: perinatal através da placenta e contato sexual (Musso et al, 2015). Além disso, estudos recentes já confirmaram que o ZIKV pode estar presente na urina, no leite materno, lágrima e saliva

(Grischott et al, 2016). Embora seja raro, a transmissão do vírus através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos também já foi relatada (Cunha et al, 2016; Nogueira et al, 2017). Uma vez na corrente sanguínea, o ZIKV é capaz de infectar diversos tipos celulares, como por exemplo, fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas, conforme já demonstrado *in vitro* (Hamel et al, 2015).

2.4. Epidemiologia

Ao longo das últimas quatro décadas, o surgimento e ressurgimento global de epidemias por arbovírus tornou-se uma crescente crise de saúde pública. O DENV começou a reaparecer globalmente no final do século XX, quadruplicou a incidência relatada nos anos 1980 e 2000 e chegou a causar cerca de 96 milhões de casos sintomáticos anualmente (Bhatt et al, 2013). Em 2015, foi confirmado o primeiro caso de infecção por ZIKV no Brasil. Essa confirmação foi realizada através de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), a partir de amostras de pacientes da região nordeste do país (Kindhauser et al, 2016). Desde então, essa infecção se espalhou rapidamente nas Américas, e a doença se tornou um problema de saúde pública, devido ao crescimento exponencial, e concomitante, de recém-nascidos apresentando microcefalia (Ali et al, 2017).

A epidemia de ZIKV apresentou aproximadamente 30.000 casos registrados no Brasil (Faria et al, 2016). Muitos casos de ZIKV, conforme já referido anteriormente, são assintomáticos (Musso et al, 2014), além disso, existe o risco de reações cruzadas com DENV no diagnóstico. Isso se dá pelo fato de que muitos anticorpos anti-ZIKV e anti-DENV são estruturalmente semelhantes. De fato, foi sugerido que a reação cruzada desses anticorpos pode aumentar a infecção por ZIKV em indivíduos previamente infectados por DENV (Paul et al, 2016).

Dados epidemiológicos indicam que até 6 de janeiro de 2016, foram relatados 4.783 casos de infecção em 21 estados nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil. No período, a incidência de microcefalia foi maior do que em anos anteriores, atingindo 99,7 por 100.000 nascimentos vivos e incluindo 76 óbitos de neonatos (Simoes et al, 2016).

2.5. Características estruturais e ciclo replicativo dos flavivírus

Os vírus do gênero *Flavivirus* têm aproximadamente 50 nm de diâmetro, possuem um envelope lipídico, no qual estão inseridas glicoproteínas de membrana, e um nucleocapsídeo icosaédrico (Lazear & Diamond, 2016) conforme ilustrado esquematicamente na figura 1A. O genoma dos flavivírus é constituído por RNA de fita simples de polaridade positiva, o qual contém metilguanossina (cap) na região terminal 5', não apresentando poliadenilação na região 3'. Além disso, o genoma dos vírus desse gênero, é de aproximadamente 11 kb, e codifica uma única poliproteína a qual é clivada pós-traducionalmente por proteases virais e do hospedeiro, originando três proteínas estruturais e sete não-estruturais (NS) (Lindenbach et al., 2007; Kuno & Chang 2007) (Figura 1B).

As proteínas estruturais são: proteína do capsídeo (C), a pré-membrana (prM) e proteína do envelope (E). A proteína C é a primeira a ser sintetizada, se liga ao RNA viral para formar o nucleocapsídeo, prM previne a fusão prematura da partícula viral nascente com a membrana plasmática da célula hospedeira e parece ser importante ao correto dobramento da proteína E, a qual, por sua vez, é a principal e maior proteína estrutural dos flavivírus, sendo responsável por atividades biológicas ao longo do ciclo viral. A proteína E medeia a ligação, fusão e entrada do vírus na célula alvo (Mukhopadhyay et al, 2005).

As proteínas NS são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, e elas têm funções na replicação, montagem, maturação e patogenicidade viral, atuando também na atenuação de respostas antivirais do hospedeiro (Diamond & Pierson, 2015). NS1 e NS4A participam da replicação viral, já a proteína NS2 está envolvida nos processos de montagem e liberação dos vírions. A NS3 e a NS2B possuem papéis proteolíticos e, a NS5 atua como RNA polimerase e metil-transferase RNA-dependentes, participando da metilação da estrutura de 5'CAP (Lindenbach et al., 2007; Kuno & Chang 2007).

Figura 1 – Esquemas da estrutura e RNA genômico dos flavivírus. (A) Esquema representativo do nucleocapsídeo em volta do RNA genômico viral. Os vírions dos flavivírus são envelopados, esféricos, com cerca de 50 nm de diâmetro e as proteínas prM e E da superfície estão dispostas em um formato icosaédrico. (B) Esquema representativo do RNA genômico viral, que apresenta uma única fase de leitura aberta que codifica três proteínas estruturais (capsídeo - C, pré-membrana - prM, e envelope - E) e sete proteínas NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5). (A) modificado de Lin et al, 2018. (B) Retirado de Guzman et al. 2018.

O ciclo replicativo dos flavivírus tem início a partir do momento em que o vírus se liga à receptores específicos na superfície da célula alvo e, logo após essa ligação, o vírus entra na célula hospedeira por meio de endocitose. No interior do endossomo, que provê um ambiente mais ácido que o meio extracelular, desencadeia-se uma mudança conformacional de maneira irreversível na proteína E (que passa de dímero para trímero). Essa mudança conformacional em E, promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e consequente liberação do nucleocapsídeo viral no citosol (Bressanelli et al, 2004; Modis et al, 2004). Uma vez que o nucleocapsídeo é liberado no citosol, o RNA genômico viral é traduzido e inserido na membrana do RE de forma co-traducional, originando uma poliproteína. Essa poliproteína precursora é processada dando origem à três proteínas estruturais e sete proteínas NS, conforme mencionado anteriormente (Fernandez-Garcia et al, 2009). Os flavivírus replicam-se associados à membrana do RE rugoso, por meio de interações que envolvem proteínas NS virais, o RNA viral e fatores da célula hospedeira (Mukhopadhyay et al, 2005).

A síntese de novas partículas virais ocorre no RE, onde o nucleocapsídeo é envelopado. Os vírions imaturos são transportados através de vesículas membranosas pela via secretória da célula produtora, e, durante esse processo ocorre a clivagem final de prM por ação de uma protease do hospedeiro chamada furina. Subsequentemente, as partículas recém-produzidas, em maturação, são liberadas pela célula hospedeira por exocitose (Lindenbach et al, 2007; Shi & Gao, 2017;). Apesar dos estudos realizados com diferentes membros do gênero *Flavivirus*, sobretudo DENV, WNV e JEV, muitos dos eventos moleculares envolvidos nas etapas finais do ciclo replicativo dos flavivírus permanecem desconhecidos. Em especial, pouco se sabe em relação ao ciclo replicativo de ZIKV. Conforme explicado anteriormente, a figura a seguir ilustra o modelo aceito para o ciclo replicativo dos flavivírus (Figura 2).

Figura 2 – Ciclo replicativo dos flavivírus. Ilustração esquemática do ciclo replicativo de DENV. O vírus se liga a receptores específicos na superfície da célula alvo. Uma vez no interior da célula, a membrana viral funde-se com a membrana endossomal e o RNA genômico viral é liberado no citosol. O RNA viral é codificado e traduzido em um único polipeptídeo, o qual é co-traducionalmente translocado na membrana do RE e clivado em dez proteínas. O genoma viral é replicado. A montagem do vírus ocorre na superfície do RE. As partículas virais imaturas são transportadas através do complexo de Golgi e da rede trans-Golgi (TGN – *trans-Golgi network*), onde a maturação é iniciada para que elas se convertam em partículas infecciosas. Por último, as partículas virais em processo de maturação, são liberadas pela célula hospedeira por exocitose (Retirado de Mukhopadhyay et al, 2005).

2.6. A maquinaria ESCRT

Os *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRTs) compõem uma maquinaria celular necessária em diversos processos envolvendo a deformação e fissão de membrana (Schmidt & Teis, 2012). Essa maquinaria, por exemplo, rege a formação de vesículas intraluminais (ILVs) de endossomos tardios, também conhecidos como corpos multivesiculares (MVBs) que fazem a entrega de proteínas ubiquitinadas e de lipídeos para degradação em lisossomos (Gruenberg & Stenmark, 2004). Durante a seleção das proteínas ubiquitinadas destinadas ao interior dos MVBs, a maquinaria ESCRT monta-se de forma organizada e sequencial (Schmidt & Teis, 2012). Um outro processo em que essa maquinaria tem função importante, é na citocinese, processo que ocorre no final da divisão celular e envolve fissão de membrana, culminando com a separação das duas células-filhas (Stoten & Carlton, 2018).

A maquinaria ESCRT consiste de quatro complexos principais: ESCRT-0, -I, -II, e III; além de outros componentes como: a proteína acessória Alix e a AAA ATPase Vps4 (Raiborg & Stenmark, 2009). ESCRT-0 é responsável pelo recrutamento de cargas ubiquitinadas, ESCRT-I e -II estão envolvidos na invaginação da membrana endossomal e o ESCRT-III tem uma ação direta na fissão da membrana e brotamento da ILV (Wollert et al, 2009; Wollert & Hurley, 2010).

O ESCRT-0 inicia a via dos MVBs e é responsável pelo recrutamento de cargas ubiquitinadas (Schmidt & Teis, 2012), sendo composto por duas subunidades: Hrs e STAM 1/2 (Vsp27 e Hse1 em leveduras, respectivamente) (Henne et al, 2011). As subunidades Hrs e STAM 1/2 se ligam a fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3), presente na membrana endossomal e induz o recrutamento de ESCRT-I para essas membranas (Bache et al, 2003; Katzmann et al, 2003; Henne et al, 2011) (Figura 3).

ESCRT-I, foi o primeiro ESCRT a ser caracterizado e consiste de quatro subunidades: Tsg101, hVps28, Vps37A,B,C, hMvb12A,B (Vps23, Vps28, Vsp37 e MVB12 em leveduras, respectivamente) (Henne et al, 2011; Katzmann et al, 2003). O ESCRT-II também é um heterotetrâmero formado pelas subunidades: EAP45, EAP30 e EAP20 (Vps36, Vps22 e Vps25 em leveduras, respectivamente) (Henne et al, 2011) e possui um domínio GLUE (*GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45*), que funciona como um conector permitindo a ligação de ESCRT-II com ESCRT-I (Schmidt & Teis, 2012). Assim, subunidades de ESCRT-I interagem com as subunidades de ESCRT-II

recrutando-o, e ambos os complexos contém subunidades ligantes de ubiquitina que contribuem para o direcionamento de cargas ubiquitinadas e brotamento da membrana para o interior dos MVBs (Wollert & Hurley, 2010) (Figura 3).

ESCRT-III é composto pelas subunidades: CHMP6, CHMP4A,B,C, CHMP3 e CHMP2A,B (Vps20, Snf7, Vps24, Vps2 para leveduras respectivamente) (Henne et al, 2011), as quais exercem funções específicas. A montagem do ESCRT-III ocorre de forma organizada e direcional. As proteínas do complexo são recrutadas, subsequentemente ativadas e sofrem mudanças conformacionais permitindo o recrutamento das outras proteínas do complexo. (Henne et al, 2011; Raiborg & Stenmark, 2009; Schmidt & Teis, 2012).

A interação entre os ESCRTs II e III permite o desenvolvimento de uma invaginação na membrana do endossomo, a qual dará origem à ILV. ESCRT-III atua no fechamento dessa vesícula através da formação de um “pescoço” ou “gargalo” da vesícula e catalisa a cisão da membrana (Wollert et al, 2009), que permite a liberação da vesícula no lúmen do endossomo/MVB. ESCRT-III também é necessário para o recrutamento de Vps4, uma AAA ATPase que catalisa a dissociação dos ESCRTs da membrana endossomal por meio da hidrólise de ATP (Figura 3). Sem a atividade de Vps4, a maquinaria ESCRT acumula-se nas membranas do endossomo e o direcionamento da carga pela via dos MVBs é bloqueado (Babst et al, 1997; Babst et al, 1998).

Os processos de montagem e brotamento de vírus envelopados ocorrem através do remodelamento de domínios de membrana, direcionando essas porções para o interior de compartimentos celulares, ou mesmo para o exterior da célula quando o brotamento viral ocorre na membrana plasmática. Esses eventos de deformação de membrana para montagem de vírus, são topologicamente equivalentes aos envolvidos na formação de ILVs em endossomos. De fato, a maquinaria ESCRT está envolvida na montagem e brotamento de muitos vírus envelopados (Schmidt & Teis, 2012).

Figura 3 - Esquema demonstrando o funcionamento da maquinaria ESCRT na membrana de endossomos. O ESCRT-0 recruta cargas ubiquitinadas e essa ligação de proteínas com o ESCRT-0, direciona os ESCRTs I e II para a membrana do endossomo, onde inicia o processo de invaginação. Imediatamente as proteínas do ESCRT-III são recrutadas ao local e são elas que fazem o fechamento e formação da vesícula intraluminal (ILV). Por último, a ATPase VPS4 finaliza o procedimento desmontando toda a estrutura dos ESCRTs reciclando-os para que um novo processo possa acontecer (Retirado de Silva-Januario et al., Exosome Biogenesis (capítulo de livro) 2016).

2.7. A maquinaria ESCRT e os flavivírus

Estudos recentes demonstram que as etapas de replicação do genoma e montagem de alguns flavivírus, como, por exemplo, DENV e JEV, ocorre no RE (Li et al, 2015; Tabata et al, 2016). Além disso, esses processos envolvem a ativação de maquinarias da célula hospedeira que deformam as membranas do RE (Welsch et al, 2009). Nas células infectadas, os flavivírus induzem a formação de invaginações que originam vesículas de cerca de 90nm de largura que se acumulam no RE. Essas vesículas projetadas para o lumen do RE são os locais onde os vírions imaturos se abrigam até que ocorra o seu brotamento para o citoplasma. Essas vesículas que carregam os vírions, formam uma rede membranosa contínua no RE. Além disso, foi sugerido fortemente que essas vesículas são o local de replicação do RNA viral (Chatel-Chaix & Bartenschlager, 2014). O processo de brotamento dos vírions imaturos no RE, ocorre através das proteínas prM e E. Além disso, estudos têm revelado que as proteínas virais NS2A e NS3, também possuem um papel fundamental nesse processo de brotamento viral no RE (Carpp et al, 2011; Chiou et al, 2003).

O recente estudo por Tabata et al. (2016) demonstrou que a maquinaria ESCRT é recrutada para os sítios de replicação de JEV e DENV no RE. Nesse estudo foram identificadas algumas proteínas ESCRT, como por exemplo, CHMP2A, CHMP3, CHMP4A, CHMP4B e CHMP4C, como fatores que são recrutados para a organela de replicação viral em células infectadas e funcionam na formação de partículas virais na membrana do RE. Nesse estudo, foi demonstrado que os flavivírus, assim como outros vírus de RNA, são capazes de apropriar-se do mecanismo celular normalmente utilizado para a formação de vesículas dos MVBs, para gerar seus próprios envelopes. O referido estudo também mostrou, por meio de experimentos de RNA de interferência, que algumas proteínas ESCRT como TSG101, CHMP2, CHMP3 e CHMP4 são necessárias para a produção eficiente de JEV e DENV, sugerindo que essas características podem ser comuns ao gênero *Flavivirus*.

OBJETIVO

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar sítios de montagem do vírus Zika na célula hospedeira e identificar fatores celulares que regulam o tráfego intracelular de proteínas envolvidos nesses processos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Identificar organelas nas quais as proteínas virais estão localizadas, que podem atuar como plataformas de montagem do ZIKV.

3.2.2. Verificar se o funcionamento da maquinaria ESCRT é requerido no ciclo replicativo do ZIKV.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares

As linhagens de células utilizadas para os experimentos deste trabalho foram C6/36 (*Aedes albopictus*, mosquito) importantes para o cultivo e propagação do vírus, e células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano) utilizadas para a titulação do estoque de ZIKV. Após a obtenção das alíquotas de vírus devidamente titulados (90 mL – título de $1,9 \times 10^7$ PFU/mL), buscou-se testar diversas linhagens de células com o objetivo de encontrar uma que fosse susceptível a infecção por ZIKV. Essas células foram: H4 (célula epitelial de neuroglioma humano), HeLa CCL2 (célula epitelial humana de colo de útero), A549 (células epiteliais de adenocarcinoma de alvéolo pulmonar humano), SK-N-SH (célula de neuroblastoma humano), FHA (linhagem de astrócito humano) e U251 (células de glioblastoma humano). Entre todos os tipos celulares testados a linhagem U251 foi que se mostrou mais susceptível à infecção por ZIKV. As outras células testadas apresentaram pouca ou nenhuma infecção.

As células C6/36 foram cultivadas em meio comercial Leibovitz L15 (*Vitrocell Embriolife*). As células Vero, H4, HeLa, A549, SK-N-SH e U251 foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen, Gibco, *Grand Island*, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. E as células FHA foram cultivadas em meio DMEM com adição de MEN (vitamina) e 2 mM de glutamina. Todas as células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e monitoradas com o auxílio de microscópio invertido Nikon TMS.

Em todos os experimentos de infecção viral realizados nesse estudo, as linhagens celulares infectadas com ZIKV foram mantidas em DMEM suplementado com 2% v/v de SFB e 1% v/v de solução de penicilina/estreptomicina, a 37 °C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2 Estabelecimento do estoque do ZIKV

Todos os experimentos de infecção das células por ZIKV foram realizados no Laboratório de Patogênese Viral, no Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP – USP,

sob coordenação do professor Dr. Eurico de Arruda Neto (FMRP, USP, Ribeirão Preto, SP).

Uma alíquota do ZIKV original foi adquirida no Instituto Evandro Chagas, a partir do plasma sanguíneo de um feto infectado por transmissão congênita, abortado no estado do Ceará, e foi gentilmente cedido pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (CPV-FMRP-USP). O vírus foi propagado em cultura de células C6/36, através de três passagens seriadas, nas quais os sobrenadantes foram coletados, e utilizados para inoculação de novas monocamadas de células. O estoque viral foi estabelecido a partir do sobrenadante resultante dessas passagens, foram alíquotados e congelados em ultrafreezer a -80 °C. A titulação e a curva de replicação viral do estoque foram realizadas através do método Ensaio de Placa conforme descrito no item 4.5.

4.3 Experimentos de infecção de células com ZIKV

Monocamadas semiconfluentes de células foram crescidas em placas de 24 poços (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA), contendo lamínulas de vidro de 13 mm (Deckglaser, Alemanha). Após 24 horas do plaqueamento, as células foram lavadas com tampão *phosphate buffered saline* (PBS) estéril gelado e inoculadas com o estoque de ZIKV em uma *multiplicity of infection* (M.O.I.) de 5. As células foram incubadas com o inóculo viral por 2 horas a 4 °C sob agitação leve, para adsorção das partículas virais à membrana plasmática. Após esse período, o inóculo foi então removido, as monocamadas celulares lavadas com PBS estéril gelado e, em seguida, foi adicionado meio DMEM com 2% SFB aquecido a 37 °C para permitir a entrada viral sincronizada. Posteriormente, as células foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ para início da contagem dos tempos de infecção. Decorridos os tempos de infecção, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C quando necessário, as células foram lavadas com PBS estéril e depois processadas de acordo com protocolo de cada metodologia utilizada nas análises posteriores.

4.4 Curva de replicação do ZIKV

A caracterização da curva de replicação do ZIKV foi realizada de acordo com o seguinte protocolo. Monocamadas de células U251, contendo aproximadamente 5×10^4

células, foram crescidas em placas de 24 poços (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas com tampão PBS estéril gelado e inoculadas com o estoque de ZIKV (M.O.I. = 5). Prosseguiu-se com a infecção de acordo com o protocolo descrito no tópico 4.3. Amostras de sobrenadante e lisado de células foram coletadas separadamente nos seguintes tempos pós-infecção: 0, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas. Os controles negativos consistiram em células não infectadas. Amostras de sobrenadante foram coletadas, e as células aderidas foram lavadas por com PBS estéril gelado, e, em seguida, foram removidas mecanicamente, ressuspensas em 500 µL de meio DMEM com 2% de SFB. Todas as amostras foram congeladas a -80 °C. Após todo esse processo, foi feito o experimento de Ensaio de Placa, onde células Vero foram aderidas em duplicatas em placas de 24 poços para cada tempo pós-infecção. Após 24h de cultivo, as células foram lavadas com tampão PBS estéril gelado e inoculadas com as alíquotas dos respectivos tempos pós infecção descritas acima. Após 1 hora as células foram lavadas novamente e logo depois, foram adicionados 500 µL de meio overlay (meio DMEM com 2% de SFB e 3% de carboximetilcelulose – CMC). Posteriormente a esse procedimento, as placas são incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por seis dias, e após é realizada a revelação do ensaio com solução cristal violeta à 0,1%. Assim, é feito um cálculo a partir da formação de placas em cada poço, obtendo-se o resultado final em *plaque forming unit* (PFU).

4.5 Ensaio de Placa para a titulação viral

Células C6/36 foram aquiescidas em placas de 24 poços para fazer titulação do ZIKV. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (MOI=1) sob agitação a 4°C por 2 horas para a adsorção do vírus. Após este processo, as células foram lavadas com PBS estéril gelado e incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Logo após, células Vero foram aderidas em placas de 24 poços e, por diluição seriada, infectadas com as alíquotas de sobrenadante de células C6/36 obtidos conforme descrito acima. Posteriormente a isso, as células Vero infectadas foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Seguidos seis dias de incubação, foi feita a revelação do ensaio com solução cristal violeta à 0,1% e observado a formação de placas em cada condição, dando o resultado final em PFU por mL.

4.6 Silenciamento de Tsg101 em células U251

Foi utilizado um protocolo para reduzir os níveis endógenos de TSG101 (ESCRT-I) em células U251 por RNA de interferência (RNAi). O tratamento com *small interfering* RNA (siRNA) foi utilizado uma vez. Inicialmente após as células terem sido plaqueadas e incubadas em condições de cultura por 24h, foram transfectados nas células os respectivos siRNAs para a proteína TSG101. Os siRNA foram adquiridos da Sigma-Aldrich, foram utilizadas duas sequências Tsg101 humana: sequência nº1 (5'CCUCCAGUCUUCUCUCGUC-3'), e sequência nº2 (5'CUCAAUGCCUUGAAACGAA-3'). Como controle negativo foi utilizado o siRNA (SIC001, Sigma-Aldrich).

A transfecção foi feita com Lipofectamina 3000 (*Life Technologies*) e o siRNA foi adquirido da *Dharmacon RNA Technologies* (Lafayette, CO). Então, após esses procedimentos, a placa foi incubada em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por um período de 24h. Logo após esse tempo, as células foram lavadas com PBS estéril e os lisados e sobrenadantes foram coletados e processados para *Western Blot* ou Ensaio de Placa de acordo para os respectivos protocolos.

4.7 Imunofluorescência e Microscopia Confocal

As células foram aderidas em lamínulas de vidro, fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Saponina em PBS. As células foram incubadas com anticorpos primários e secundários em solução de bloqueio (0,2% de gelatina porcina mais 0,1% de Saponina em PBS). As lamínulas foram então montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glase, Bielefeld, Alemanha) utilizando, para isso, *Fluoromount G* (EM Sciences, Hatfield, PA, EUA). As células foram visualizadas por meio de microscópio de fluorescência Leica CTR 6000 e microscópio confocal Leica TCS SP5, disponível no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC), e microscópio confocal Zeiss LSM 780, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifotão (LMMM), ambos pertencentes ao departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP onde este projeto foi realizado.

4.8 Anticorpos utilizados para imunofluorescência indireta

Anticorpos primários

- Anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV, gentilmente cedido pelo professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (CPV-FMRP-USP), na diluição final de 1:300.
- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-flavivírus 4G2 (Millipore) na diluição final de 1:100. Este anticorpo reconhece a proteína E do envelope viral.
- Anticorpo de coelho anti-calnexina humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EUA) na diluição final de 1:100.
- Anticorpo monoclonal de ovelha anti-TGN46 humana (AbD Serotec, MorphoSys UK Ltda, Oxford, RU) na diluição final de 1:500.
- Anticorpo policlonal de coelho anti-SNX-2 (sortinexina-2), gentilmente cedido pelo Dr. Juan S. Bonifacino, National Institutes of Health, EUA, e utilizado na diluição final de 1:500.
- Anticorpo monoclonal anti-EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) de camundongo (BD Biosciences – San Jose SA) na diluição final de 1:200.
- Anticorpo policlonal anti-LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) de coelho (Cell Signaling) na diluição final de 1:500.
- Anticorpo monoclonal anti-CD63 de camundongo (BD Biosciences – San Jose SA) na diluição final de 1:200.

Anticorpos secundários

- Anticorpo de jumento anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 ou a Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR), na diluição final de 1:1000.
- Anticorpo de jumento anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 594 ou Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR), usado na diluição final de 1:1000.

4.9. Anticorpos utilizados para Western Blot

Anticorpos primários

- Anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV, na diluição de 1:1000.

- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-Flavivírus 4G2, na diluição de 1:1000.
- Anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina (Thermo Scientific – Rockford, IL) na diluição final de 1:10000.
- Anticorpo monoclonal de coelho anti-GAPDH humana (*Sigma Aldrich, Buchs, SG, Switzerland*) na diluição de 1:3000.

Anticorpos secundários

- Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EUA), na diluição de 1:10000.
- Anticorpo policlonal anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EUA), na diluição de 1:10000.

4.10. Extração de proteínas e *Western Blot*

4.10.1. Extração de proteínas

As células aderidas foram lavadas cinco vezes com PBS. Em seguida, as células foram removidas da placa incubando-as em solução de 2 mM de EDTA (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) em PBS, por 5 minutos em condições de cultivo. Depois, foram ressuspensas e centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi congelado a -80 °C. Os pellets de células foram lisados em tampão de lise (50 mM de Tris pH 7.5, 150 mM de NaCl, 10% (v/v) glicerol, 5mM de EDTA, 1% (v/v) Triton X-100) contendo coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 20 minutos em ambiente gelado. Depois, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi quantificada pela medida da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro *Evolution 60S* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para equalização das amostras.

4.10.2. SDS-PAGE e Eletrotransferência

Para separação das proteínas, foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em gel de separação com concentração de 10% de poliacrilamida preparado a partir de solução de acrilamida/bis-acrilamida a 30% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os géis de separação eram também compostos por: 0,4 M de Tris-HCl pH 8,8; 0,1% p/v de duodecil sulfato de sódio (SDS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); 0,06% v/v de TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,03% p/v de persulfato de amônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os géis de empilhamento, com concentração de 5% de poliacrilamida, foram preparados a partir da mesma solução de acrilamida/bis-acrilamida referida anteriormente e eram também compostos por: 0,07 M de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% p/v de SDS; 0,018% v/v de TEMED; e 0,03% p/v de persulfato de amônia. Antes da aplicação das amostras no gel para eletroforese, as mesmas foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos, para desnaturação das proteínas. A eletroforese foi realizada com voltagem constante de 90 volts, em tampão de corrida eletroforética composto por 25 mM de Trizma® base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 190 mM de glicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,1% de SDS.

As proteínas separadas em géis de poliacrilamida a 10% foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 µm (Amersham Biosciences, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA). O suporte para transferência foi colocado dentro de uma cuba de transferência, de modo que a membrana de nitrocelulose ficasse voltada para o polo positivo. A eletrotransferência foi realizada a 360 mA por 1 hora em tampão de transferência (25 mM Trizma® base, 190 mM Glicina em 10% v/v de Metanol). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração com solução de 0,1% p/v de Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em 5% de ácido acético.⁷

4.10.3. Imunodeteção em membrana de nitrocelulose

As membranas foram lavadas com 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em PBS (PBS-T) e incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado e 1% de BSA em PBS-T) por 1 hora sob agitação. As membranas foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com PBS-T, incubadas com solução de anticorpo primário (de acordo com as concentrações dos anticorpos descritas no tópico 4.9) por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente por cinco vezes de 5 minutos com PBS-T e incubadas com solução de anticorpos secundários adequados conjugados com HRP (de acordo com as concentrações dos anticorpos descritas no tópico 4.10) por 1h sob agitação. Para detecção das proteínas utilizou-se solução de ECL (0.1 M de Tris-HCl pH 8.5, 1.25 mM de Luminol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 0.2 mM de ácido cumárico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0.02% de H₂O₂) com subsequente captação do sinal de luminescência por luminômetro (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA) acoplado ao sistema digital e software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Células de glioblastoma humano são susceptíveis à infecção por ZIKV

Inicialmente foi realizado um pequeno screening com diferentes linhagens de células humanas para identificar uma linhagem celular susceptível à infecção por ZIKV (figura 4).

Figura 4 – Screening de células infectadas por ZIKV. Diferentes linhagens de células humanas foram cultivadas e aderidas em lamíulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (24h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 1. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV, seguida pela incubação com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa-488 e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica CTR 6000 Fluorescence. Barra de escala: 10 μ m.

A partir dos resultados obtidos na figura 4, é possível observar que tanto as células U251 (células de glioblastoma humano) como as células A549 (células epiteliais de adenocarcinoma de alvéolo pulmonar humano), se mostraram susceptíveis à infecção por ZIKV, enquanto que para as outras linhagens celulares testadas (células HeLa e H4) não houve detecção da infecção. Nas células U251 a detecção de proteínas virais no tempo de 24 horas pós-infecção (h p.i.) é clara e reprodutível, por esse motivo, essa linhagem celular foi escolhida para continuar todos os próximos experimentos desse trabalho.

5.2. Curva de replicação viral de ZIKV

Inicialmente foram realizados experimentos no sentido de se obter um estoque viral com título suficientemente alto para a realização de múltiplos experimentos. Nesse sentido, o ZIKV foi cultivado em células C6/36 (célula de mosquito *Aedes albopictus*) e, a partir de ensaio de placa, foi possível obter o título viral. Para isto, células Vero foram incubadas com ZIKV em placas de 24 poços, em estufa a 37°C, por 6 dias e reveladas com solução de cristal violeta. O título obtido para o estoque foi de $1,9 \times 10^7$ PFU/mL. A partir da obtenção deste estoque viral, foram feitos experimentos de ensaio de placa novamente para a obtenção da curva de replicação viral do ZIKV em células U251. Para isso, foram utilizadas primeiramente células de glioblastoma (U251) para a obtenção das alíquotas virais, e as quais foram usadas para infectar células Vero para a finalização do experimento e obtenção da curva de replicação, conforme já descrito no item 4.4 dos materiais e métodos (Figura 5).

Figura 5 – Curva de Replicação viral ZIKV do lisado celular. Células U251 foram infectadas em placas de 24 poços para a realização da cinética viral, tempos de infecção mostrados na figura. Os sobrenatantes e os lisados celulares foram coletados em seus respectivos tempos e congelados. Após esse processo, células Vero foram infectadas em placas de 24 poços em diluições seriadas das alíquotas virais de U251. As células Vero foram incubadas por seis dias a 37°C e após isso, foram reveladas com cristal violeta. A partir disso, obteve-se formações de placas que foram contabilizadas para a efetuação do gráfico acima.

Na Figura 5, estão apresentados os títulos virais intracelulares ao longo da curva de replicação. Pode-se observar que, imediatamente após o início da infecção (tempo 0h p.i.), foram detectadas partículas virais infecciosas no lisado celular, indicando a adesão de vírus à membrana plasmática das células hospedeiras. Entre 6 e 12h p.i. pode-se notar o eclipse viral, período em que ocorre o desnudamento da partícula viral e início da síntese de proteínas virais. Logo após, com mais de 12 h p.i., é possível detectar um aumento das

partículas virais na célula. A partir de 48h p.i. inicia o processo de morte celular e, consequentemente, a estabilização ou redução dos títulos virais intracelulares.

5.3. Distribuição intracelular do ZIKV ao longo do ciclo replicativo

Em paralelo aos experimentos para detectar a produção de partículas virais infecciosas em células U251, ao longo do ciclo replicativo, descritos acima, investigou-se a localização subcelular de proteínas virais nessas células ao longo do tempo. Para este fim, células U251 foram aderidas em lamínulas em placas de 24 poços e infectadas com ZIKV em uma MOI de 5 e em diferentes tempos pós-infecção as células foram fixadas e analisadas por microscopia. Os resultados desses experimentos são apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Cinética do ZIKV. Células U251 foram cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (B, C, D, E e F) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV, seguida pela incubação com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa-488 e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica CTR 6000 Fluorescence. Barra de escala: 10 μ m.

As células U251 analisadas foram susceptíveis à infecção pelo ZIKV. Na figura 6 é possível observar a dispersão da marcação viral no citoplasma celular ao longo do tempo após a infecção. No tempo de 6h p.i. pode-se observar pequenos pontos distribuídos pela célula, o que possivelmente representa partículas virais dentro de endossomos no início

da infecção na célula hospedeira. Logo após, com 15h p.i. já é possível verificar uma maior distribuição da marcação viral no citoplasma, o que poderia representar proteínas virais recém-sintetizadas no RE e formação de novas partículas. Nos tempos seguintes, nota-se um aumento da intensidade da marcação viral na célula. Como pode-se ser examinado, no tempo de 27h p.i. há uma grande distribuição da marcação viral na célula indicando que neste tempo o vírus poderia já estar no complexo de Golgi e vesículas de transporte. Porém experimentos utilizando marcadores para esses compartimentos são necessários para que seja possível confirmar tais localizações.

5.4. O ZIKV entra no citosol da célula hospedeira a partir de endossomos primários contendo o marcador EEA1.

Após a observação do padrão de distribuição subcelular das proteínas virais, o próximo passo foi tentar identificar os compartimentos intracelulares nos quais as proteínas virais estão presentes ao longo do ciclo replicativo. Inicialmente, foi investigada a presença do ZIKV em endossomos nas primeiras horas p.i. Para essas análises, utilizamos o anticorpo monoclonal de camundongo anti-flavivírus 4G2 (isotipo IgG2A) que reconhece a proteína E do envelope viral, que passou a ser disponível no laboratório, ao invés do anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV utilizado nos experimentos da Figura 6. Tal mudança foi necessária pois alguns dos anticorpos utilizados neste estudo para marcar organelas (como o *Early Endosome Antigen 1*, EEA1), também são monoclonais de camundongo (isotipo IgG1), sendo possível a combinação com o anticorpo anti-E, utilizando anticorpos secundários isotipo-específicos. A partir do resultado da figura 7 e tabela 1 é possível observar colocalização e a sua quantificação entre as proteínas E de ZIKV e as proteínas de endossomo primário - EEA1, 3h p.i. O nível de colocalização entre a proteína E e a EEA1 foi quantificado pelo coeficiente de Manders (tM) (Costes et al, 2004).

Figura 7 – Marcação do Ensossomo Primário (*Early Endosome Antigen 1* – EEA1). Células de glioblastoma U251 foram cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (3h p.i. e 6h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Flavivírus 4G2 (IgG2A) e policlonal de camundongo anti-EEA1 (IgG1), seguido por marcação com anticorpos secundários isotipos específicos anti-camundongo conjugados com Alexa-594 ou Alexa-488 respectivamente e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica TCS SP5 no laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC). Barra de escala: 10 μ m.

Coefficiente de Manders (*Threshold*)

	tM1	tM2
Proteína E – 3h p.i. e EEA1	0,30 ± 0,08	0,32 ± 0,07
Proteína E – 6h p.i. e EEA1	0,07 ± 0,03	0,15 ± 0,02

Tabela 1 – Análise quantitativa da colocalização entre sinais da proteína E (ZIKV) e EEA1. Quantificação da colocalização foi determinada usando o *plugin Colocalization Threshold* no *software Image J* que determina o coeficiente de Manders (M) aplicando o *threshold* (tM), calculado automaticamente de acordo com o algoritmo de Costes et al. (2004). Este coeficiente pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não co-localização e colocalização total, respectivamente, entre os sinais de cada canal. A tabela mostra a média ± o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre o sinal da proteína E do ZIKV e a proteína EEA1. Foram analisadas pelo menos 3 células.

Ao analisar células 6h p.i., notou-se uma forte redução nos níveis de colocalização entre a proteína E e o marcador de endossomo primário (Figura 7, Tabela 1). Esses resultados indicam que nos tempos iniciais de infecção, o vírus se encontra em endossomo primário, conforme indicado no modelo geral para flavivírus, e que com 6h p.i. o vírus possivelmente esteja saindo do endossomo primário para seguir seu ciclo na célula. Em 6h p.i. o ZIKV pode continuar no endossomo primário até que este mature para endossomo tardio (e perca EEA1), ou então pode estar se direcionando ao citosol, após a sua fusão com a membrana do endossomo primário, e foi isso que investigou-se mais adiante nesse trabalho.

Figura 8 – Marcação do endossomo primário (Sortinexina-2 – SNX-2). Células de glioblastoma U251 foram cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (3h p.i. e 6h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Flavivírus 4G2 e policlonal de coelho anti-SNX2, seguido por marcação com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho conjugados com Alexa-594 ou Alexa-488 respectivamente e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica TCS SP5 no laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC). Barra de escala: 10 μ m.

Diferentemente dos resultados apontados na figura 7, em que foi visto colocalização entre as proteínas EEA1 e as proteínas E de ZIKV, na figura 8, não foi possível observar colocalização entre o vírus e o marcador de endossomo primário Sortinexina-2 (SNX-2), com 3 ou 6h p.i. Em 3h p.i. foi visto que o ZIKV está em endossomo primário (figura 7), porém apesar de SNX-2 ser uma proteína presente em endossomo primário, nesse tempo após infecção, não observa-se colocalização. Pondera-se que a causa dessa divergência de resultados, seja pelo fato de as proteínas EEA1 e a SNX-2 estarem presentes em domínios distintos de endossomos primários. A SNX-2 é responsável pela reciclagem de proteínas do endossomo primário para o TGN, enquanto que EEA1 tem função na

ancoragem e reconhecimento de proteínas presentes em vesículas endocíticas, antes da fusão com endossomos. Além disso, com 6h p.i., o vírus pode estar sendo direcionado para o citosol pronto para liberar o seu RNA viral, como já foi descrito anteriormente.

Figura 9 – Marcação do ensossomo tardio (CD63). Células de glioblastoma U251 foram cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (3 e 6h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Flavivírus 4G2 (IgG2A) e policlonal de camundongo anti-CD63 (IgG1), seguido por marcação com anticorpos secundários isotipos específicos anti-camundongo conjugados com Alexa-594 ou Alexa-488 respectivamente e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica TCS SP5 no laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC). Barra de escala: 10 μ m.

Figura 10 – Marcação de lisossomo – *Lysosomal-associated membrane protein 1* (LAMP-1). Células de glioblastoma U251 foram cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (3 e 6h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Flavivírus 4G2 e policlonal de coelho anti-LAMP-1, seguido por marcação com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho conjugados com Alexa-594 ou Alexa-488 respectivamente e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica TCS SP5 no laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC). Barra de escala: 10 μ m.

Com o intuito de saber se o vírus, além de estar sendo direcionado para endossomos primários, poderia também atingir endossomos tardios, foram realizados ensaios adicionais de imunofluorescência indireta, marcando a proteína CD63 presente nessa organela e ao mesmo tempo marcando a proteína E de ZIKV. Além disso, também foram marcados os lisossomos, utilizando anticorpo anti-LAMP-1. Contudo, conforme os resultados das figuras 9 e 10 demonstram, tanto em 3 quanto em 6h p.i., não há colocalização entre CD63 ou LAMP-1 com as proteínas E do ZIKV. Esses resultados indicam que o vírus é liberado no citosol para dar início aos processos de tradução e

montagem, a partir dos endossomos primários, sem atingir endossomos tardios e lisossomos, antes de 6 h p.i.

5.5. O RE e complexo de Golgi são prováveis sítios de montagem de partículas do ZIKV em células de glioblastoma.

A partir do resultado mostrado na figura 11, é possível observar colocalização entre proteínas do ZIKV (anticorpo policlonal anti-ZIKV) e a proteínas calnexina em 15h p.i. Através da quantificação feita pelo coeficiente de Manders (tM) na tabela 2, pode-se confirmar um alto nível de colocalização entre ZIKV e CNX. A calnexina é uma proteína transmembrana residente no RE com função de chaperona, que auxilia no dobramento de proteínas recém-sintetizadas nesta organela. Ressalta-se aqui, que nos experimentos realizados notou-se uma tendência de aumento do sinal para calnexina em células infectadas em relação a células vizinhas não infectadas (figura 11), podendo representar aumento da expressão desta proteína em decorrência da infecção. Porém essa possibilidade não foi investigada neste trabalho.

Além disso, é interessante notar que, após 21h de infecção, ocorre uma redução no nível de colocalização (Figura 11 e Tabela 2), provavelmente demonstrando que o ZIKV neste tempo já estaria saindo do RE, e, possivelmente direcionando-se para outra organela ou estrutura celular que auxilie no tráfego do vírus através da célula. Por isso, é provável que o RE possa estar envolvido no ciclo replicativo do ZIKV, participando da formação de fábricas virais como ocorre para outros flavivírus, como por exemplo, DENV e JEV (Li et al, 2015; Tabata et al, 2016). Ainda, os resultados acima descritos apresentam uma provável evidência de que pelo menos um componente da membrana do RE, a calnexina, faça parte da composição das fábricas virais, e que esta proteína possa estar envolvida no processo de replicação do ZIKV.

Figura 11 – O ZIKV localiza-se no RE 15h p.i. (Calnexina - CNX). Células de glioblastoma U251 foram cultivadas e aderidas em laminulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (15 e 21h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV e policlonal de coelho anti-CNX, seguido por marcação com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho conjugados com Alexa-488 ou Alexa-594 respectivamente e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica TCS SP5 no laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC). Barra de escala: 10 μ m.

Coefficiente de Manders (*Threshold*)

	tM1	tM2
ZIKV – 15h p.i. e CNX	0,71 $\pm$ 0,005	0,79 $\pm$ 0,03
ZIKV – 21h p.i. e CNX	0,52 $\pm$ 0,17	0,47 $\pm$ 0,11

Tabela 2 – Análise quantitativa da colocalização entre sinais ZIKV e CNX. Quantificação da colocalização foi determinada usando o *plugin Colocalization Threshold* no *software Image J* que determina o coeficiente de Manders (M) aplicando o *threshold* (tM), calculado automaticamente de acordo com o algoritmo de Costes et al. (2004). Este coeficiente pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não colocalização e colocalização total, respectivamente, entre os sinais de cada canal. A tabela mostra a média $\pm$ o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre o sinal de ZIKV e a proteína CNX.

Para determinar se o ZIKV utiliza o complexo de Golgi durante a replicação, investigamos a presença de proteínas virais no *trans-Golgi Network* (TGN) ao longo do tempo p.i. Para tanto, utilizando como marcador a proteína TGN46, uma proteína transmembrana que cicla entre a membrana plasmática e o TGN, concentrando-se nesta última organela no estado de equilíbrio. A partir do resultado mostrado na figura 12 e também analisando a quantificação do nível de colocalização (Tabela 3), nota-se que há

sobreposição parcial entre proteínas do ZIKV (anticorpo policlonal anti-ZIKV) e a proteína TGN-46 15h p.i. Entretanto, com 27h p.i., pode-se observar alta colocalização (Tabela 3) entre proteínas do ZIKV e as proteínas TGN46. A partir disso, é provável que o complexo de Golgi possa estar envolvido no ciclo replicativo do ZIKV, servindo de plataforma para o tráfego do vírus através da via secretória, até sua maturação e saída desta, para infectar células vizinhas, como já foi relatado para DENV e JEV (Li et al, 2015; Tabata et al, 2016).

Figura 12 – Marcação complexo de Golgi (*trans-Golgi Network* TGN-46). Células de glioblastoma U251 foram cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro para o ensaio de imunofluorescência. Após 24h de incubação, as células foram infectadas (15 e 27h p.i.) ou não (controle) com ZIKV em uma MOI de 5. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpo policlonal de camundongo anti-ZIKV e anticorpo monoclonal de ovelha anti-TGN46, seguido por marcação com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-ovelha conjugados com Alexa-488 ou Alexa-594 respectivamente e DAPI. As imagens foram capturadas no microscópio Leica TCS SP5 no laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC). Barra de escala: 10 μ m.

Coeficiente de Manders (*Threshold*)

	tM1	tM2
ZIKV – 15h p.i. e TGN46	0,36 ± 0,04	0,23 ± 0,06
ZIKV – 27h p.i. e TGN46	0,50 ± 0,06	0,38 ± 0,01

Tabela 3 – Análise quantitativa da colocalização entre sinais ZIKV e TGN46. Quantificação da colocalização foi determinada usando o *plugin Colocalization Threshold* no *software Image J* que determina o coeficiente de Manders (M) aplicando o *threshold* (tM), calculado automaticamente de acordo com o algoritmo de Costes et al. (2004). Este coeficiente pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não colocalização e colocalização total, respectivamente, entre os sinais de cada canal. A tabela mostra a média ± o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre o sinal de ZIKV e a proteína TGN46.

5.6. Silenciamento da proteína TSG101 de ESCRT-I em células infectadas com ZIKV

Tabata et al. (2016) demonstraram que alguns componentes da maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transporte*) são recrutados para os sítios de replicação de JEV no RE. Assim, decidiu-se testar se o silenciamento da TSG101, um componente de ESCRT-I, poderia alterar o padrão de produção do vírus em células U251.

Figura 13 – Teste da eficiência de duas diferentes sequências de siRNA para o silenciamento TSG101 em células U251. Células U251 foram tratadas ou não com siRNA controle ou siRNA específico para TSG101, proteína de ESCRT-I. Os extratos totais de proteínas foram separados por eletroforese em SDS-PAGE (gel 10%) e analisados por *Western blot* utilizando anticorpos contra: TSG101 e GAPDH, conforme indicado. A massa molecular (em kDa) está indicada à esquerda da figura.

De acordo com a figura 13 o silenciamento da proteína TSG101 nas células U251, através da técnica de siRNA, foi eficiente tanto para a sequência 1 quanto para a sequência 2. Após os experimentos testes para verificar se o silenciamento de TSG101 seria eficiente, o próximo passo foi analisar se, de fato, essa proteína do ESCRT-I teria papel importante na replicação do vírus na célula. Para isso, foram realizados outros experimentos de silenciamento e ensaios de placa, conforme demonstrado na figura 14.

Figura 14 – O silenciamento de TSG101 em células U251 parece afetar a replicação viral. A partir da técnica de siRNA para silenciamento da proteína TSG101 e depois de ensaio de placa, é possível visualizar a formação de Unidades Formadoras de Placas (PFU). Nesse ensaio foram utilizadas duas diferentes sequências de siTSG101.

Conforme os dados da figura 14 demonstram, parece que a proteína TSG101 possui participação importante na replicação do ZIKV na célula. Foi possível observar que quando existem menores níveis de TSG101 na célula ocorre a diminuição do título viral, significando que provavelmente, o vírus necessita desta proteína para se replicar de forma eficiente na célula hospedeira.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Pouco se conhece sobre o ciclo replicativo do ZIKV na célula hospedeira. A maioria da informação disponível sobre os mecanismos de montagem e brotamento de flavivírus foi determinado em estudos utilizando DENV e JEV (Li et al, 2015; Mukhopadhyay et al, 2005; Tabata et al, 2016). Dessa forma, um dos principais objetivos desse estudo foi investigar os processos de tráfego intracelular e montagem do ZIKV, ou seja, estudar a localização subcelular do ZIKV durante a infecção.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo (figura 4), foi possível observar que as células de glioblastoma U251 se mostraram susceptíveis à infecção por ZIKV, corroborando com as informações de estudos que mostraram que existe tropismo do vírus por células do SNC (Garcez et al, 2016; Offerdahl et al, 2017). Além disso, marcações virais são encontradas dispersas por todo o citosol, mas também concentradas em regiões perinucleares ao longo do tempo. Conforme pode-se ver nas figuras 7 a 10, com 3h p.i. já é possível detectar proteínas virais distribuídas pelo citosol em padrão vesicular. Essas proteínas virais, provavelmente estão em endossomos, conforme é demonstrado no modelo geral do ciclo replicativo de flavivírus, em que a entrada do vírus na célula alvo ocorre através de endocitose (Bressanelli et al, 2004; Modis et al, 2004; Lindenbach et al., 2007).

Com 15h p.i., (figura 6) podemos observar uma drástica mudança na marcação das estruturas virais, ou seja, pode se detectar uma maior distribuição do vírus na célula, porém nesse tempo, é possível verificar uma concentração maior das marcações virais em regiões próximas ao núcleo e em padrão reticular. Isso nos sugeriu que nesse período de infecção, o vírus provavelmente poderia estar mais concentrado no RE, o que significa que nessa fase do ciclo, possivelmente ocorre o acúmulo de proteínas virais recém-sintetizadas, a replicação do genoma e o início da montagem do vírus.

Nos tempos mais tardios de infecção, 18, 24 e 27h p.i., (Figura 6) não se observa uma grande diferença no padrão intracelular de marcação viral. No entanto, é possível avaliar que nesses tempos após infecção, as partículas/proteínas virais se encaminham para o complexo de Golgi, porém, são necessários mais experimentos que comprovem esse acontecimento. Mesmo assim, essa característica está de acordo com os dados já demonstrados em estudos sobre outros flavivírus (Kaufmann & Rossmann, 2011; Mukhopadhyay et al, 2005; Pierson & Diamond, 2012).

Após a observação da cinética viral, o passo seguinte foi analisar a marcação viral utilizando, para isso, marcadores de proteínas presentes em organelas como: endossomo primário, endossomo tardio, lisossomo, RE e complexo de Golgi, conforme observado nas figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente.

Na figura 7, onde foram feitas marcações com anticorpo anti-EEA1 (proteína presente em endossomo primário), pode-se ver claramente que existe colocalização entre as proteínas E virais e a proteína de endossomo primário. Esse resultado indica a entrada do vírus na célula por meio de endossomos, e com 3h p.i. já está ocorrendo esse processo. Com 6h p.i., observa-se uma baixa colocalização de proteínas virais com EEA1, indicando que o vírus já esteja em processo de saída do endossomo primário e esteja sendo direcionado para o citosol da célula alvo. Na figura 8 a localização do vírus em endossomos primário foi investigada utilizando um diferente marcador, o anticorpo anti-SNX-2, uma proteína presente nesse endossomo, porém situada em uma região diferente de EEA1, responsável pela reciclagem de proteínas do endossomo para o TGN. Nas imagens da figura 8, não é visto colocalização de SNX2 com as proteínas virais, tanto em 3 como em 6h p.i. Talvez indicando, que o vírus possa estar em uma região específica do endossomo primário, ou seja, segundo os resultados desse trabalho, talvez o ZIKV esteja mais próximo da proteína de aprisionamento EEA1.

Depois de analisar os endossomos primários, o próximo passo foi estudar os endossomos tardios, com o objetivo de saber por qual via o ZIKV estaria seguindo. De acordo com os resultados das figuras 9 e 10, também não foi observada colocalização entre ZIKV e CD63 (proteína presente majoritariamente em endossomos tardios) ou LAMP-1 (proteína presente majoritariamente em lisossomos). Com 3h p.i. ou com 6h p.i não foi possível observar colocalização em nenhuma dessas organelas, indicando que talvez por motivos de maturação dos endossomos, do inicial para o tardio, a mudança de pH (Shi & Gao, 2017) provavelmente esteja fazendo com que o vírus seja liberado no citosol ainda no endossomo primário e não chegue aos endossomos tardios ou lisossomos.

A partir do resultado mostrado na figura 11, foi possível analisar colocalização entre as proteínas do ZIKV e as proteínas calnexina em um tempo de 15h p.i., esse dado está de acordo com as afirmações discutidas anteriormente, e, além disso, esses resultados corroboram com os estudos anteriores para flavivírus, mostrando que o polipeptídeo precursor das proteínas virais é direcionado para o RE durante a tradução (Kaufmann & Rossmann, 2011);(Shi & Gao, 2017). No entanto, quando examinamos o tempo de 21h

p.i., notamos uma clara diferença na distribuição subcelular de proteínas virais. Nesse tempo, há uma redução na colocalização com calnexina, e, isso, provavelmente demonstra que o vírus já estaria sendo direcionado para outra organela celular. Por isso, como já foi mostrado em diversos estudos de flavivírus (Kaufmann & Rossmann, 2011; Mukhopadhyay et al, 2005; Pierson & Diamond, 2012; Shi & Gao, 2017) o RE é importante para os processos de replicação e montagem do ZIKV.

Em seguida, foram realizados experimentos para examinar o direcionamento de proteínas virais para o complexo de Golgi, seguindo a via secretória da célula. Na figura 12, as células infectadas com ZIKV são marcadas com anticorpo anti-TGN46, proteína presente no TGN. Analisando as imagens da figura 12, foi possível observar que com um tempo de 15h p.i. há colocalização entre as proteínas TGN46 e as proteínas virais, indicando que talvez o vírus, apesar de estar mais concentrado no RE, já estaria, ao mesmo tempo, sendo direcionado para o complexo de Golgi. Contudo, quando examinamos o tempo de 27h p.i., podemos observar claramente um aumento na colocalização entre essas proteínas (TGN46 e ZIKV). Essa observação sugere que em 27h p.i., o vírus está no TGN. Partindo desse princípio, é provável que o complexo de Golgi possa estar também envolvido no ciclo replicativo do ZIKV. Esses dados corroboram com os resultados da figura 6, onde as marcações virais com 24 e 27h p.i. pareciam estar concentradas na região perinuclear.

Outro objetivo desse trabalho foi testar se a maquinaria ESCRT da célula hospedeira é requerida na montagem e externalização do ZIKV. Por isso, em um primeiro momento, foi testado o silenciamento da proteína TSG101 de ESCRT-I, através da técnica de siRNA, nas células U251. Conforme o resultado apresentado na figura 13, notou-se eficiência no silenciamento dessa proteína na célula.

Em seguida, foram realizados experimentos de replicação viral em células silenciadas de TSG101. Após analisarmos a presença de vírus infecciosos no sobrenadante de células controle ou silenciadas para TSG101, pode-se observar que a depleção de TSG101 em células produtoras do vírus, resulta em queda da produção viral (redução de aproximadamente 50% no título viral). Esse resultado preliminar indica que ESCRT-I tenha participação importante na replicação do ZIKV, possivelmente na montagem e/ou externalização.

De acordo com os estudos feitos por Tabata et al. (2016), publicados durante a realização deste projeto, a proteína TSG101 tem papel importante na replicação e

montagem de JEV. Os nossos resultados estão de acordo com esses estudos. Nesse mesmo estudo de Tabata et al. (2016), eles também observaram que diferentemente da proteína TSG101, a proteína acessória da maquinaria ESCRT, Alix, não apresentou importância na propagação viral. Entretanto, um outro estudo envolvendo o vírus da Febre Amarela (YF) e a proteína Alix (Carpp et al, 2011), demonstrou que a proteína não estrutural NS3 do vírus interage com Alix. Foi demonstrado nesse estudo, que a expressão de um dominante negativo para a proteína Alix não interferiu na replicação ou na montagem viral, porém foi observado que a interação entre Alix e NS3 tem papel importante na liberação de partículas virais. Assim, é proposto que a proteína de YFV, NS3, recruta Alix para auxiliar na liberação de partículas infecciosas. A NS3 provavelmente está presente em locais de montagem de partículas virais, pois a clivagem das proteínas C-prM pelas NS2B-NS3 é necessária para a liberação de partículas infecciosas.

Apesar da existência dos estudos citados sobre a importância da maquinaria ESCRTs na propagação e/ou liberação de partículas virais de outros flavivírus, é evidente que mais experimentos precisam ser feitos a fim de confirmar os dados do presente trabalho e determinar se outros componentes da maquinaria ESCRT participam da replicação de ZIKV.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- As células da linhagem de glioblastoma U251 são susceptíveis à infecção por ZIKV.
- A infecção por ZIKV em células U251 apresenta um período de eclipse entre 6 e 12h p.i.
- A entrada viral ocorre a partir de endossomos primários e o vírus não vai para endossomos tardios, e sim, é liberado para o citosol onde vai dar início ao processo de replicação.
- Com 15h p.i. o ZIKV se encontra no RE e, ao mesmo tempo, já está sendo direcionado para o complexo de Golgi.
- Após 27h de infecção, o ZIKV já se encontra no complexo de Golgi no TGN provavelmente sendo direcionado à sua maturação e saída da célula.
- A proteína TSG101 presente no complexo ESCRT-I parece ter participação importante na replicação viral na célula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed QA, Memish ZA (2017) Zika in Singapore: implications for Saudi Arabia. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit* **23**: 311-313

Ali S, Gugliemini O, Harber S, Harrison A, Houle L, Ivory J, Kersten S, Khan R, Kim J, LeBoa C, Nez-Whitfield E, O'Marr J, Rothenberg E, Segnitz RM, Sila S, Verwillow A, Vogt M, Yang A, Mordecai EA (2017) Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases* **11**: e0005135

Babst M, Sato TK, Banta LM, Emr SD (1997) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *The EMBO journal* **16**: 1820-1831

Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO journal* **17**: 2982-2993

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**: 504-507

Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA (2004) Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO journal* **23**: 728-738

Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC (2011) Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes and infection* **13**: 85-95

Chatel-Chaix L, Bartenschlager R (2014) Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. *Journal of virology* **88**: 5907-5911

Chiou CT, Hu CC, Chen PH, Liao CL, Lin YL, Wang JJ (2003) Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *The Journal of general virology* **84**: 2795-2805

Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal* **86**: 3993-4003

Cunha MS, Esposito DL, Rocco IM, Maeda AY, Vasami FG, Nogueira JS, de Souza RP, Suzuki A, Addas-Carvalho M, Barjas-Castro Mde L, Resende MR, Stucchi RS, Boin Ide F, Katz G, Angerami

RN, da Fonseca BA (2016) First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Genome announcements* **4**

Diamond MS, Pierson TC (2015) Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* **162**: 488-492

Duarte G, Moron AF, Timerman A, Fernandes CE, Mariani Neto C, Almeida Filho GL, Werner Junior H, Espirito Santo H, Steibel JAP, Bortoletti Filho J, Andrade JBB, Burla M, Silva de Sa MF, Busso NE, Giraldo PC, Moreira de Sa RA, Passini Junior R, Mattar R, Francisco RPV (2017) Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia* **39**: 235-248

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine* **360**: 2536-2543

Faria NR, Azevedo R, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Theze J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, Vasami F, Macedo FLL, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz ACR, Nunes BT, Medeiros DBA, Rodrigues DSG, Queiroz ALN, da Silva EVP, Henriques DF, da Rosa EST, de Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LMN, Simith DB, Messina JP, Abade L, Lourenco J, Alcantara LCJ, de Lima MM, Giovanetti M, Hay SI, de Oliveira RS, Lemos PDS, de Oliveira LF, de Lima CPS, da Silva SP, de Vasconcelos JM, Franco L, Cardoso JF, Vianez-Junior J, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, Creatore M, Coelho GE, de Oliveira WK, Tesh R, Pybus OG, Nunes MRT, Vasconcelos PFC (2016) Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**: 345-349

Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A (2009) Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe* **5**: 318-328

Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK (2016) Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* **352**: 816-818

Grischott F, Puhan M, Hatz C, Schlagenhauf P (2016) Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel medicine and infectious disease* **14**: 313-330

Gruenberg J, Stenmark H (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 317-323

Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Despres P, Amara A, Yssel H, Misse D (2015) Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology* **89**: 8880-8896

Hamel R, Liegeois F, Wichit S, Pompon J, Diop F, Talignani L, Thomas F, Despres P, Yssel H, Misse D (2016) Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes and infection* **18**: 441-449

Harris SR (2013) Congenital idiopathic microcephaly in an infant: congruence of head size with developmental motor delay. *Developmental neurorehabilitation* **16**: 129-132

Heang V, Yasuda CY, Sovann L, Haddow AD, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, Kasper MR (2012) Zika virus infection, Cambodia, 2010. *Emerging infectious diseases* **18**: 349-351

Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT pathway. *Developmental cell* **21**: 77-91

Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M (2014) Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses* **44**: 302-307

Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD (2003) Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of cell biology* **162**: 413-423

Kaufmann B, Rossmann MG (2011) Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and infection* **13**: 1-9

Kelvin AA, Banner D, Pamplona L, Alencar C, Rubino S, Heukelbach J (2016) ZIKATracker: A mobile App for reporting cases of ZIKV worldwide. *Journal of infection in developing countries* **10**: 113-115

Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C (2016) Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization* **94**: 675-686C

Lazear HM, Diamond MS (2016) Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *Journal of virology* **90**: 4864-4875

Li J, Li D (2016) [Epidemiological characteristics of Zika virus disease]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* **37**: 329-334

Li MY, Grandadam M, Kwok K, Lagache T, Siu YL, Zhang JS, Sayteng K, Kudelko M, Qin CF, Olivo-Marin JC, Bruzzone R, Wang PG (2015) KDEL Receptors Assist Dengue Virus Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Cell reports*

Lopes MH, Miyaji KT, Infante V (2016) Zika virus. *Revista da Associacao Medica Brasileira* **62**: 4-9

Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A (1969) Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **18**: 411-415

Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pizem J, Petrovec M, Avsic Zupanc T (2016) Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine* **374**: 951-958

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**: 313-319

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology* **3**: 13-22

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J (2014) Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **19**

Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM (2015) Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases* **21**: 359-361

Nogueira ML, Estofolete CF, Terzian AC, Mascarin do Vale EP, da Silva RC, da Silva RF, Ramalho HJ, Fernandes Charpiot IM, Vasilakis N, Abbud-Filho M (2017) Zika Virus Infection and Solid Organ Transplantation: A New Challenge. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **17**: 791-795

Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastere S, Valour F, Baudouin L, Mallet H, Musso D, Ghawche F (2014) Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **19**

Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME (2017) Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and Aedes albopictus cell lines. *Virology* **501**: 54-62

Paul A, Vibhuti A, Raj S (2016) Molecular docking NS4B of DENV 1-4 with known bioactive phytochemicals. *Bioinformation* **12**: 140-148

Pierson TC, Diamond MS (2012) Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Current opinion in virology* **2**: 168-175

Raiborg C, Stenmark H (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**: 445-452

Ramalho FS, Yamamoto AY, da Silva LL, Figueiredo LTM, Rocha LB, Neder L, Teixeira SR, Apolinario LA, Ramalho LNZ, Silva DM, Coutinho CM, Melli PP, Augusto MJ, Santoro LB, Duarte G, Mussi-Pinhata MM (2017) Congenital Zika Virus Infection Induces Severe Spinal Cord Injury. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **65**: 687-690

Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosario MS, Costa F, Archanjo G, Santos LA, Nery N, Jr., Vasilakis N, Ko AI, de Almeida AR (2016) Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS neglected tropical diseases* **10**: e0004517

Schmidt O, Teis D (2012) The ESCRT machinery. *Current biology : CB* **22**: R116-120

Schulz S, Mensah MA, de Vries H, Frober R, Romeike B, Schneider U, Borte S, Schindler D, Kentouche K (2018) Microcephaly, short stature, and limb abnormality disorder due to novel autosomal biallelic DONSON mutations in two German siblings. *European journal of human genetics : EJHG*

Shi Y, Gao GF (2017) Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in biochemical sciences* **42**: 443-456

Silva M, Esposito DLA, Fonseca B (2017) Digital disease data: what is the impact on the Zika virus epidemic? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **50**: 437-438

Simoes R, Buzzini R, Bernardo W, Cardoso F, Salomao A, Cerri G (2016) Zika virus infection and pregnancy. *Revista da Associacao Medica Brasileira* **62**: 108-115

Simpson DI (1964) Zika Virus Infection in Man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **58**: 335-338

Smithburn KC (1952) Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *Journal of immunology* **69**: 223-234

Stoten CL, Carlton JG (2018) ESCRT-dependent control of membrane remodelling during cell division. *Seminars in cell & developmental biology* **74**: 50-65

Tabata K, Arimoto M, Arakawa M, Nara A, Saito K, Omori H, Arai A, Ishikawa T, Konishi E, Suzuki R, Matsuura Y, Morita E (2016) Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell reports* **16**: 2339-2347

Weaver SC, Reisen WK (2010) Present and future arboviral threats. *Antiviral research* **85**: 328-345

Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe* **5**: 365-375

Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**: 864-869

Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**: 172-177