



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

HEVERTON VALENTIM COLAÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM
CÉLULAS DE LINHAGEM NEUROGLIAL**

Recife

2019

HEVERTON VALENTIM COLAÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM
CÉLULAS DE LINHAGEM NEUROGLIAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia

ORIENTADOR: DR LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI BRANDÃO

CO-ORIENTADORA: MS^a ALMERINDA AGRELLI

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Heverton Valentim Colaço da.
Avaliação da indução autofágica na infecção pelo vírus Zika em células de linhagem neuroglial / Heverton Valentim Colaço da Silva. – 2019.
47 f.: il.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Infecções por arbovirus. 2. Zika vírus. 3. Autofagia. I. Brandão, Lucas André Cavalcanti (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-152)

HEVERTON VALENTIM COLAÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM
CÉLULAS DE LINHAGEM NEUROGLIAL**

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de Pós-Graduação em
Patologia da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Patologia.

Aprovada em 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Ribeiro Mello Júnior (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ronald Rodrigues de Moura (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria da Glória e meus avós, Severino (*in memoriam*) e Rinalda, pelo exemplo de força e persistência.

AGRADECIMENTOS

Obrigado primeiramente a **Deus** que me permitiu concluir esta caminhada por muitas vezes árdua e por colocar pessoas especiais ao meu lado.

Ao professor e orientador, **Dr. Lucas Cavalcanti Brandão**, pelos ensinamentos, empenho, paciência, confiança, bom humor e dedicação, que foram fundamentais na elaboração deste trabalho.

A minha mãe, **Maria da Glória**, a quem sempre esteve presente em toda jornada, minha eterna companheira.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Patologia: Neyla, Ronald e Natália, obrigado pelo suporte e amizade.

Aos amigos da turma do Programa de Pós-Graduação em Patologia, sem exceções, vocês fizeram a jornada tornar-se menos cansativa. Os levarei para sempre na memória e no coração.

À Margarete, secretária do programa, meus mais sinceros agradecimentos por todo o empenho, competência e ajuda.

Aos meus amigos da turma CONEVEST por todo incentivo e companheirismo, aos meus amigos Jefferson Bezerra e Taciana Moura por todo apoio.

Obrigado em especial a minha amiga Lívia Cintra, a qual me acompanha ao longo desta minha caminhada desde o início, que sempre me apoiou e acreditou em mim.

Aos meus avós maternos, Rinalda Colaço e Severino Colaço (*in memoriam*), que sempre me apoiaram e mesmo sem estudos, foram os primeiros que me incentivaram a vida acadêmica.

Ao meu tio, Wandenberg Colaço (*in memoriam*), sempre lembrarei do orgulho e cuidado que tinha por mim e onde quer que esteja, junto com vovô, sempre farão parte das minhas conquistas.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, o qual possui semelhança com outros vírus causadores de arboviroses pertencentes a mesma família, incluindo o Vírus da Dengue (DENV), Vírus da Febre Amarela (YFV) e o Vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV). No Brasil, a infecção teve seus primeiros relatos no início do ano de 2014, tendo sido confirmado o primeiro caso em maio de 2015. Durante o surto no Brasil, as autoridades reconheceram a relação entre o vírus Zika e o aumento no número de casos de desordens neurológicas, tais como a síndrome de Guillain Barré e microcefalia. Em nível celular, das diversas alterações causadas, o processo de autofagia induzido pelo ZIKV pôde ser observado em cultivo de células humanas, ocorrendo a formação de autofagossomos com capsídeo viral. Esse evento parece ser relevante para a replicação do vírus, já que a modulação da autofagia pode influenciar no aumento do quantitativo de RNA do vírus nas células infectadas. O objetivo do estudo foi avaliar alterações na capacidade replicativa do ZIKV a partir de sua cepa contemporânea, bem como a presença e influência do mecanismo de autofagia durante a infecção em células de linhagem glial. Foi realizado o cultivo e infecção de células da linhagem U87-MG com a cepa do ZIKV PE, utilizando um MOI de 1,0. As células foram cultivadas em meio MEM (Minimum Essential Medium), suplementadas com 10% de soro fetal bovino e posteriormente realizada a incubação das células em amostras, incluindo o vírus e a presença da Rapamicina, um indutor autofágico. A análise do quantitativo da carga viral foi avaliada através de RT-qPCR e da indução autofágica pela citometria de fluxo entre as diferentes amostras. Encontramos que as células gliais tratadas com a rapamicina, o indutor autofágico propiciou a elevação da carga viral, após 4h da infecção (hpi) quando comparado aos grupos controles não tratados 2 e 4h de hpi, os quais mostraram níveis inferiores de RNA viral. Também houve um acréscimo significativo na replicação quando entre a indução autofágica após 4h da infecção em relação a 2h apresentando um *fold change* de 1,79. Desta forma, concluímos, que o aumento da autofagia induzido pela rapamicina diante da infecção pelo ZIKV mostrou uma maior capacidade de replicação viral nas células de origem glial, indicando a correlação entre o aumento da autofagia e consequente elevação da replicação de partículas virais, durante o

período inicial de 2 hpi, sugerindo que o vírus se utiliza da maquinaria autofágica em benefício próprio.

Palavras-chave: Infecções por arbovirus. Zika vírus. Autofagia.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the *Flaviviridae* family, which resembles other arbovirus-causing viruses belonging to the same family, including Dengue Virus (DENV), Yellow Fever Virus (YFV), and Fever Virus West Nile (WNV). In Brazil, the infection was first reported in early 2014, and the first case was confirmed in May 2015. During the outbreak in Brazil, authorities recognized the relationship between the Zika virus and the increase in the number of cases neurological disorders, such as Guillain Barré syndrome and microcephaly. At the cellular level, of the several alterations caused, the autophagy process induced by ZIKV could be observed in culture of human cells, occurring the formation of autophagosomes with viral capsid. This event appears to be relevant for virus replication, since modulation of autophagy may influence the increase in the amount of virus RNA produced in infected cells. The objective of the study was to evaluate changes in the replicative capacity of ZIKV from its contemporary strain, as well as the presence and influence of autophagy mechanism during infection in glial lineage cells. Cultivation and infection of U87-MG lineage with the ZIKV PE strain was performed using an MOI of 1.0. Cells were grown in MEM medium (Minimum Essential Medium), supplemented with 10% fetal bovine serum and subsequently incubated the cells in samples, including the virus and the presence of Rapamycin, an autophagic inducer. The quantitative analysis of the viral load was evaluated by RT-qPCR and autophagic induction by flow cytometry between the different samples. We found that glial cells treated with rapamycin, the autophagic inducer, increased viral load after 4h of infection (hpi) when compared to the untreated control groups 2 and 4h hpi, which showed lower levels of viral RNA. There was also a significant increase in replication when autophagic induction occurred after 4h of infection compared to 2h with a fold change of 1.79. Thus, we concluded that the increase of autophagy induced by rapamycin in the presence of ZIKV infection showed a higher viral replication capacity in glial cells, indicating the correlation between the increase in autophagy and the consequent elevation of viral particle replication during the initial period of 2 hpi, demonstrating that the virus uses autophagic machinery for its own benefit.

Keywords: Arbovirus infections. Zika virus. Autophagy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	O genoma do vírus Zika.....	18
Figura 2 –	Tipos de autofagia em células de mamíferos.....	23
Tabela 1 –	Maquinaria molecular central da autofagia.....	24
Figura 3 –	A ativação dos complexos ULK e PI3K III.....	25
Figura 4 –	Formação dos complexos de conjugação Ubiquitin like, Atg16L1 e LC3-II.....	26
Figura 5 –	Resumo esquemático da autofagia.....	28
Figura 6 –	Desenho do estudo apresentando o esquema metodológico experimental.....	34
Figura 7 –	Análise por citometria de fluxo para expressão das proteínas LC3B e SQSTM/p62.....	37
Gráfico 1 –	Análise semi-quantitativa de carga viral por RT-qPCR..	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato (<i>Adenosine monophosphate</i>)
APK	Proteína cinase ativada por AMP (<i>AMP-activated Protein Kinase</i>)
ATG	Proteína relacionada a autofagia (<i>Autophagy-related protein</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BECN1	Beclina-1 (<i>Beclin-1</i>)
LC3	Cadeia leve 3 da proteína associadas a microtúbulos 1A/1B (<i>MAP1LC3 – Microtubule -associated proteins 1A/1B light chain 3</i>)
MOI	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
mTOR	Proteína alvo de rapamicina em mamíferos (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)
MTORC1/2	mTOR complexo 1/2 (<i>mTOR Complex 1/2</i>)
PAS	Sítio de montagem do fagóforo ou estrutura pré-autofagossomal (<i>Phagophore Assembly Site or Pre-Autophagosomal Structure</i>)
PtdIns3K/PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase (<i>Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase</i>)
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (<i>Real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
STQSTM	<i>Sequestosome - 1</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
Ubl	Semelhante a ubiquitina (<i>Ubiquitin-like</i>)
ULK1	Cinase 1 semelhante à unc-51 (<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>)
UVRAG	A proteína gênica associada à resistência à radiação UV (<i>UV Radiation Resistance Associated</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ARBOVÍRUS	15
2.2	FLAVIVÍRUS.....	15
2.3	VÍRUS ZIKA.....	15
2.3.1	Histórico e Epidemiologia	15
2.3.2	Estrutura do ZIKV	17
2.3.3	Transmissão	19
2.3.4	Aspectos clínicos	20
2.4	AUTOFAGIA.....	21
2.4.1	Macroautofagia	22
2.4.2	Microautofagia	22
2.4.3	Autofagia mediada por chaperonas	23
2.4.4	Progressão molecular da autofagia	23
2.4.5	Indução	24
2.4.6	Alongamento ou expansão	26
2.4.7	Regulação	27
2.5	ZIKV E AUTOFAGIA	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	VÍRUS.....	32
4.2	CULTIVO DE CÉLULAS DA LINHAGEM U87-MG	32
4.3	TITULAÇÃO VIRAL	33

4.4	DESENHO DO ESTUDO	33
4.5	DETECÇÃO DA AUTOFAGIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	34
4.6	DETECÇÃO SEMI - QUANTITATIVA POR RT-QPCR	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, o qual possui semelhança com outros vírus causadores de arboviroses pertencentes a mesma família, incluindo o Vírus da Dengue (DENV), Vírus da Febre Amarela (YFV) e o Vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV) (CIPRIANO; MONTEIRO, 2016; JUNIOR et al., 2015).

No Brasil, a infecção teve seus primeiros relatos no início do ano de 2014, tendo sido confirmado o primeiro caso em maio de 2015. Entre janeiro e julho do mesmo ano, 121 casos de manifestações neurológicas associadas a síndrome de Guillain-Barré foram reportados em vários estados da região nordeste, levantando a hipótese de uma possível associação com o ZIKV (BRASIL, 2017a).

Durante o surto no Brasil, as autoridades reconheceram a relação entre o vírus Zika e o aparecimento de casos de microcefalia e má formações congênitas em fetos de gestantes expostas ao vírus (SCHULER-FACCINI et al., 2016).

Ao todo, cerca de 3530 casos suspeitos de microcefalia foram identificados em 724 municípios de 21 estados até janeiro de 2016 (CIPRIANO; MONTEIRO, 2016). O estado de Pernambuco foi o primeiro a identificar o aumento de casos de microcefalia, sendo o estado com maior número de casos (CIPRIANO; MONTEIRO, 2016).

Em Fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO) declarou o surto de ZIKV como uma “Emergência Global” (WHO, 2016).

Em 2017 foram registrados 17.593 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país. Destes, 6.679 (42,9%) puderam ser confirmados, com 728 casos em gestantes (BRASIL, 2017b). Até outubro de 2018 foram notificados mais de 7.544 casos prováveis; destes, 3.038 (43,8%) foram confirmados, a região Sudeste foi a mais acometida com 2.799 casos prováveis, correspondendo a 36,8%, seguida pela região nordeste (2.184 casos;29,0%) (BRASIL, 2018).

O RNA do ZIKV foi detectado em amostras de líquido amniótico e tecido cerebral de fetos microencéfalos cujas mães foram infectadas durante a gravidez, demonstrando a capacidade do vírus em invadir e infectar tecido nervoso humano e

ultrapassar a barreira placentária (CALVET et al., 2016; NORONHA et al., 2016). No entanto, os mecanismos de morte celular e dano tecidual neurológico, e os tipos celulares envolvidos na infecção por ZIKV são pouco conhecidos (NUNES et al., 2016).

Recentemente, a ação autofágica do ZIKV pôde ser observada em cultivo de células humanas, onde ocorreu a formação de autofagossomos com capsídeo viral. Esse evento parece ser relevante para a replicação do vírus, já que a modulação da autofagia pode influenciar no aumento do quantitativo de RNA do vírus produzido nas culturas (HAMEL et al., 2015).

Estudos realizados apontaram importante associação na indução autofágica em células infectadas pelo vírus da dengue (DENV), demonstrando a importância no estudo de tal mecanismo visto que o vírus pode fazer uso da autofagia para aumentar sua replicação. Os mecanismos moleculares que regulam muitos desses processos não são bem caracterizados, portanto, pouco investigados durante a infecção viral. (HEATON; RANDALL, 2010; KHAKPOOR et al., 2009; PANYASRIVANIT et al., 2011).

Desta forma, dadas as semelhanças estruturais e biológicas entre os DENV e ZIKV, é possível que o ZIKV possa induzir mecanismos semelhantes, relacionados a resposta do hospedeiro à infecção viral. Assim, estudos que elucidem essas questões e suas relações com a severidade da doença se tornam imprescindíveis para que sejam tomadas medidas de saúde pública apropriadas e para o desenvolvimento de formas de profilaxia e tratamento contra essa arbovirose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARBOVÍRUS

O termo arbovírus, refere-se ao vírus transmitido por artrópodes, considerado uma terminologia ecológica utilizada para definir os vírus que são mantidos na natureza por transmissão biológica entre um hospedeiro vertebrado e um artrópode hematófago, como um mosquito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967).

Por sua vez a arbovirose é uma contração da expressão inglesa “*Arthropod-borne virus*” que são doenças ocasionadas por arbovírus. (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Dentre os principais arbovírus destacam-se os vírus da Zika, Dengue, Chikungunya, Febre Amarela e Febre do Nilo Ocidental sendo considerados como um problema de saúde pública com milhares de infecções a cada ano (PINGEN et al., 2016; TATTEVIN, 2012).

2.2 FLAVIVÍRUS

A família *Flaviviridae* é constituída por vírus envelopados e icosaédricos, seu genoma consiste em uma molécula de RNA de cadeia única de sentido positivo, a qual pode ser diretamente traduzida em proteína. (SMIT et al., 2011).

O gênero *Flavivirus* inclui um número invulgarmente grande de espécies taxonomicamente reconhecidas (mais de 50, das quais mais de 40 são patógenos humanos) classificados em três grupos de acordo com seus vetores: vírus transmitidos por mosquitos, vírus transmitidos por carrapatos e vírus sem vetor conhecido com distribuição global (GUBLER; G; L, 2007; MOUREAU et al., 2015).

2.3 VÍRUS ZIKA

2.3.1 Histórico e Epidemiologia

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae* e tem como característica a promoção de infecções brandas na maior parte dos casos, em que

em última instância podem se transformar em manifestações clínicas graves e severas (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

O vírus subdivide-se em duas linhagens: a asiática e a africana. Supõe-se que, na África, o vírus tenha sido mantido em um ciclo de transmissão entre primatas não-humanos (macacos e chimpanzés) e mosquitos, sendo os humanos hospedeiros ocasionais acidentais. Acredita-se que a linhagem asiática surgiu durante a década de 40 por migração do vírus africano (HADDOW et al., 1964; JUNIOR et al., 2015).

O primeiro isolamento de ZIKV ocorreu em 1947, a partir do sangue de um macaco *Rhesus* sentinela n.º 766, localizado na floresta de Zika, perto do Lago Victoria, em Uganda, e em 1948, o ZIKV também foi isolado na mesma floresta em um conjunto de mosquitos *A. africanus*. Após isto, o vírus pôde ser identificado em diversas outras localidades no continente africano e no sudeste asiático (G. W. A. DICK, M.D., B.SC., M.R.C.P. (EDIN.), 1952; MORRISON; DIAMOND, 2017; VALLE; NACIF PIMENTA; AGUIAR, 2016).

Embora o ZIKV tenha sido repetidamente isolado, apenas 16 casos em humanos foram relatados antes de abril de 2007, quando ocorreu uma epidemia de Febre Zika (ZF) na ilha de Yap, na Micronésia, onde 49 casos foram confirmados e 73% dos residentes com mais de 3 anos forneceram evidência sorológica de recente infecção por ZIKV (DUFFY et al., 2009).

A doença disseminou-se, posteriormente em 2013, na Polinésia Francesa, foi reportada uma epidemia com cerca de 19.000 casos suspeitos e 248 confirmados de pessoas infectadas pelo vírus. Em 2014, houve a confirmação da chegada do ZIKV nas Américas (provavelmente relacionado aos casos da Micronésia e Polinésia Francesa), na região da ilha de Páscoa e, em 2015, a chegada do vírus na região norte e nordeste do Brasil (JUNIOR et al., 2015; SLAVOV et al., 2016).

De março de 2015 à 29 de abril do mesmo ano, o Brasil registrou aproximadamente 7 mil casos de alterações cutâneas caracterizadas como exantema, todos provenientes da região nordeste, porém como o ZIKV tratava-se ainda de uma doença até então inexistente no país, os casos não foram diagnosticados (KINDHAUSER et al., 2016).

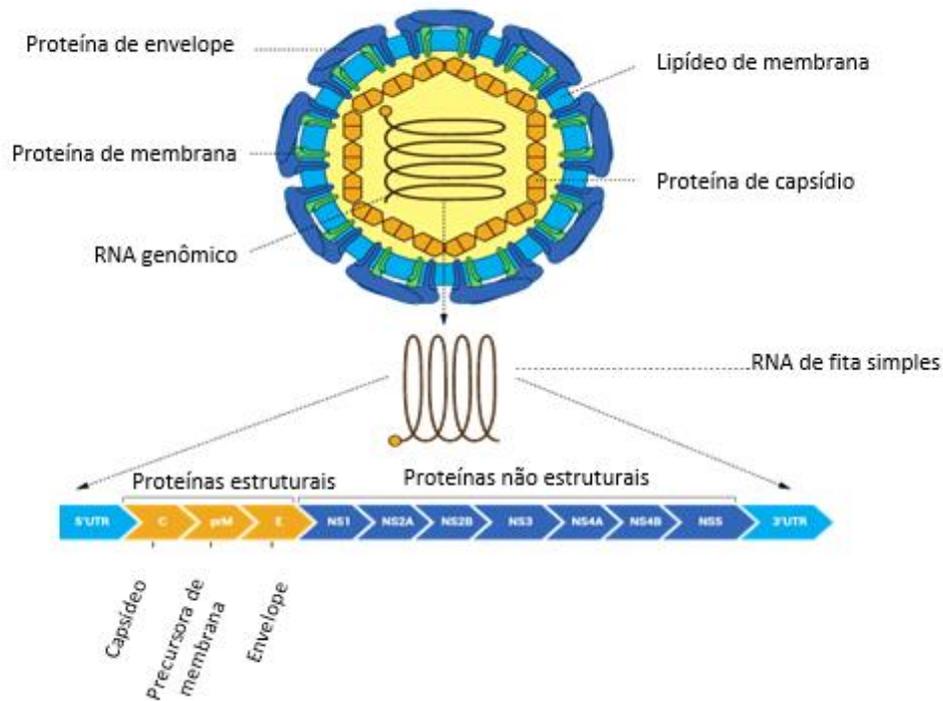
O ano de 2016 pôde ser considerado como o ano mais crítico com relação ao surto pelo ZIKV, com o número de casos de 216.207, destes, houveram 8 mortes confirmadas através de diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2016).

Nos anos subsequentes (2017-2018) houve uma queda significativa dos casos de infecção pelo ZIKV, diante o declínio as regiões que tiveram o maior número de casos neste período foram a centro-oeste e a nordeste, com um comparativo de 2017 para 2018 de 4,3 para 3,4 casos/100 mil hab. na região centro-oeste e de 9,0 a 4,1 para região nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.3.2 Estrutura do ZIKV

O ZIKV configura-se como uma partícula esférica (Figura 1) constituída por um RNA senso positivo apresentando terminações 5' e 3' flanqueando uma região de leitura aberta responsável pela tradução de um composto poliprotéico (C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) com cerca de 3200 aminoácidos (aa) posteriormente clivados através de proteases em 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M), pré-membrana (P), proteína do envelope (E) e sete proteínas não-estruturais (NS) : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CALVET et al., 2016; SLAVOV et al., 2016). (Fig. 1)

Figura 1 - O genoma do vírus Zika



Fonte: Adaptada de ASIF et al., 2017.

A proteína de capsídeo (c), é a proteína responsável pela formação do nucleocapsídeo, a qual também atua favorecendo a montagem dos vírions, pelo empacotamento do RNA genômico (CHANG et al., 2016).

A proteína M é produzida durante a maturação viral e tem como principal função a proteção à proteína E contra rearranjos. A conversão da partícula viral imatura para o vírus maturo coincide com a clivagem da proteína precursora de membrana (prM) através da protease furina ou outras enzimas (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína E é a maior proteína de superfície viral, possui estrutura de forma espiculada e projetando-se para fora do envelope viral, onde media a ligação com o receptor celular, estando envolvida portanto com diversas atividades biológicas, tais como à adsorção do vírus ao receptor celular, fusão de membrana e montagem da partícula viral. Além disso trata-se de uma proteína dimérica, possuindo em cada subunidade três domínios, em seu domínio I é responsável por montar uma estrutura em forma de barril, do tipo beta; O domínio II é disposto na superfície viral e o III forma

um painel de epítomos antigênicos que são alvos importantes para ensaios sorológicos, anticorpos neutralizantes e vacinas, o mesmo é responsável por interagir com receptores celulares e assim permitir a entrada dos vírions nas células. Adicionalmente, a perda do local de glicosilação na proteína E pode estar associado aos processos de adaptação aos mosquitos vetores e, conseqüentemente, à facilitação da transmissão (DUFFY et al., 2009).

2.3.3 Transmissão

Semelhante aos demais flavivírus, o ZIKV é transmitido primariamente por mosquitos do gênero *Aedes* (*Stegomyia*). Esses tipos de mosquitos são pertencentes à regiões tropicais e subtropicais (G. W. A. DICK, M.D., B.SC., M.R.C.P. (EDIN.), 1952; SLAVOV et al., 2016).

Diversos tipos de *Aedes* foram relacionados a esse vírus, como: *Aedes aegypti*, *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes hensilli*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes albopictus*. O *Aedes aegypti* é o vetor mais abundante na Ásia e Américas, o *Aedes hensilli* foi o principal responsável pelo surto nas ilhas Yap, o principal vetor da África não foi definitivamente identificado e o *Aedes polynesiensis* provavelmente foi o vetor responsável pela disseminação do ZIKV na Polinésia Francesa (VALLE; NACIF PIMENTA; AGUIAR, 2016).

O intervalo de tempo necessário para que uma fêmea adulta do mosquito torne-se infectante após o repasto em indivíduo infectado é de 7 - 10 dias. Esse período é denominado de período de incubação extrínseco (PIE) do ZIKV no mosquito (BARLETTO; SOUSA BARROS, 2017; VALLE; NACIF PIMENTA; AGUIAR, 2016).

Após a infecção no hospedeiro humano e a replicação em células de tecidos locais e nos nódulos linfáticos regionais, o ZIKV pode se difundir a partir dos vasos linfáticos para outros órgãos/tecidos, incluindo: o sistema nervoso central, músculos esqueléticos, miocárdio, via corrente sanguínea; e ser transmitido para o feto, verticalmente (CHANG et al., 2016).

A via sexual também corresponde a um fator de transmissibilidade do vírus, como aborda o estudo de Russel et al., 2016 em que revela a presença do ZIKV em amostras de sêmem.

2.3.4 Aspectos clínicos

Boa parte das infecções são assintomáticas (cerca de 80% dos casos). Quando o indivíduo manifesta um quadro febril, esse geralmente tende a ser leve, de dois a sete dias (BASARAB et al., 2016; CONCI; GOES; LUIZ, 2017). A sintomatologia da infecção não é específica, podendo ser confundida com outras arboviroses, como Dengue e Chinkugunya (JUNIOR et al., 2015).

Os sintomas da febre Zika são: febre baixa, cefaleia, exantema maculopapular pruriginoso por face, tronco, palmas das mãos e planta dos pés. A febre tende a desaparecer no intervalo de um ou dois dias após o surgimento do exantema, podendo persistir por cerca de dois a 14 dias (EICKMANN et al., 2016; DE M. CAMPOS et al., 2016). Diferentemente de infecções causadas pelo DENV, complicações hemorrágicas e de choque não foram relatadas (BASARAB et al., 2016).

São relatadas dores articulares e musculares, que podem ou não vir de edema, com duração média de três a cinco dias desaparecendo após uma semana, diferindo das dores ocasionadas pelo vírus da Chinkugunya (CHIKV) pela menor intensidade e pelas áreas afetadas. O ZIKV também pode causar complicações oftalmológicas, como conjuntivite. Outras manifestações inespecíficas também podem acontecer como orbitalgia, anorexia, dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos e vertigem (CIPRIANO; MONTEIRO, 2016; KAM et al., 2017).

Ademais, apesar de, em geral, ser uma infecção de origem benigna, algumas complicações podem ocorrer como problemas de desordens neurológicas, como por exemplo a síndrome de Guillain Barré e a microcefalia em recém nascidos (CONCI; GOES; LUIZ, 2017; LIANG et al., 2016; NUNES et al., 2016; PLOURDE; BLOCH, 2016).

A síndrome de Guillain-Barré (GBS) é um transtorno imunomediado de início agudo do sistema nervoso periférico. Os pacientes com esta doença geralmente

manifestam fraqueza aguda progressiva, hiporreflexia ou arreflexia e níveis elevados de proteína no LCR (DING et al., 2018).

Associações entre a infecção pelo ZIKV e síndrome de Guillain Barré puderam ser evidenciadas previamente na Oceania e na América do Sul. 74 de 8.750 (0,8%) dos pacientes com suspeita de infecção por ZIKV na Polinésia Francesa apresentaram algum tipo de desordem neurológica, desses, quarenta e dois dos 74 (56,8%) foram evidenciados com a síndrome de Guillain-Barré, representando um aumento de 20 vezes na estatística local. Relatos similares foram reportados na América do sul, juntamente com outros tipos de alterações, como a microcefalia em recém nascidos (ECDC, 2016; OEHLER et al., 2014).

Com relação a microcefalia, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em conjunto com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e o International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research (ICBDSR), considera microcefalia quando o perímetro cefálico é menor que dois ou mais desvios-padrão do que o indicado para o sexo, idade ou período de gestação, os bebês nascem com perímetro cefálico igual ou inferior a 32 centímetros (CONCI; GOES; LUIZ, 2017).

Em estudos realizados em mulheres que apresentaram características de infecção intrauterina e pós natal pelo vírus Zika, além da microcefalia outras alterações também puderam ser notadas, tais como: retardo do crescimento intrauterino, má formações cerebrais, desproporção craniofacial, acúmulo de pele na região occipital, disfagia e artrogripose estando envolvido neste contexto alterações celulares a nível de autofagia. (PRATA-BARBOSA et al., 2018)(PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015).

2.4 AUTOFAGIA

Autofagia, um processo catabólico vital que degrada componentes citoplasmáticos em lisossomos, serve como uma resposta citoprotetora essencial aos estresses patológicos que ocorrem em doenças como câncer, isquemia e infecção (PARZYCH; KLIONSKY, 2014).

Além do seu papel como via de resposta ao estresse, a autofagia desempenha uma função de controle de qualidade essencial na célula, promovendo o *turnover* basal de proteínas e organelas de longa duração, além de degradar seletivamente os componentes celulares danificados. Esta função homeostática protege contra uma grande variedade de doenças, incluindo neurodegeneração, miopatia, doença hepática e diabetes (MURROW; DEBNATH, 2013).

Existem três vias principais de degradação autofágica (Figura 2), que diferem entre si, essencialmente, pelos meios de entrega de carga para o lisossomo, são: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA) (MURROW; DEBNATH, 2013).

2.4.1 Macroautofagia

Comumente conhecida como autofagia, é iniciada através da formação de uma membrana em volta do material alvo a ser degradado, tal estrutura é denominada como fagóforo. A membrana que constitui o fagóforo pode ter origem de diversos sítios celulares, tais como, da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou mesmo da membrana mitocondrial externa. A fusão das extremidades do fagóforo dá origem ao autofagossomo, estrutura constituída por uma dupla membrana, uma interna e outra externa, a qual posteriormente funde-se ao lisossomo originando o autolisossomo, sendo o conteúdo degradado por ação de enzimas lisossomais (HEATON; RANDALL, 2010)(GALLUZZI et al., 2017).

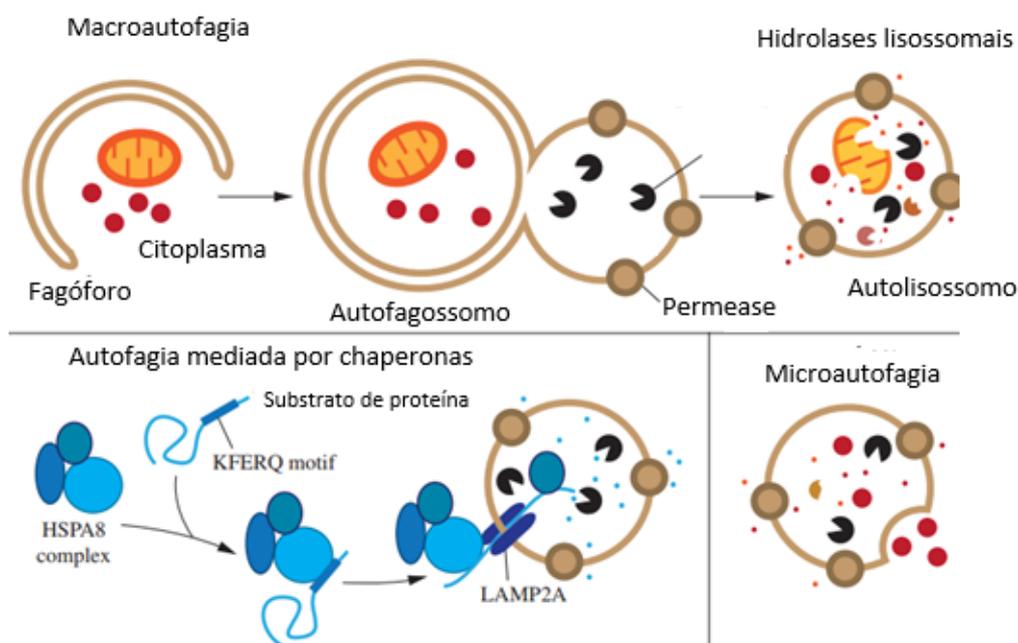
2.4.2 Microautofagia

Trata-se de uma via conservada em que os componentes presentes no citoplasma celular são envolvidos e incorporados de forma direta por invaginações ou protrusões da membrana dos lisossomos (GALLUZZI et al., 2017).

2.4.3 Autofagia mediada por chaperonas

Esse mecanismo autofágico ocorre apenas em células de mamíferos e diferentemente dos demais é altamente específico, sendo mediado por chaperonas (figura 2), as quais permitem a translocação de proteínas específicas para o interior de lisossomos através da membrana e por interação com o receptor LAMP-2A, resultando na degradação proteica (KAUSHIK; CUERVO, 2012).

Figura 2 – Tipos de autofagia em células de mamíferos



Fonte: Adaptada de Parzych; Klionsky, 2014.

2.4.4 Progressão molecular da autofagia

O processo autofágico da macroautofagia (conhecida como autofagia propriamente dita), pode ser dividido em três etapas, indução, alongamento e maturação, sendo as mesmas controladas através de um grupo de mais de 20 proteínas pertencentes à família ATG (AuTophagy related genes). Estas proteínas podem ser agrupadas na forma de complexos (Tabela 1) de acordo com as etapas da autofagia (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; THOME et al., 2016).

Tabela 1 – Maquinaria molecular central da autofagia

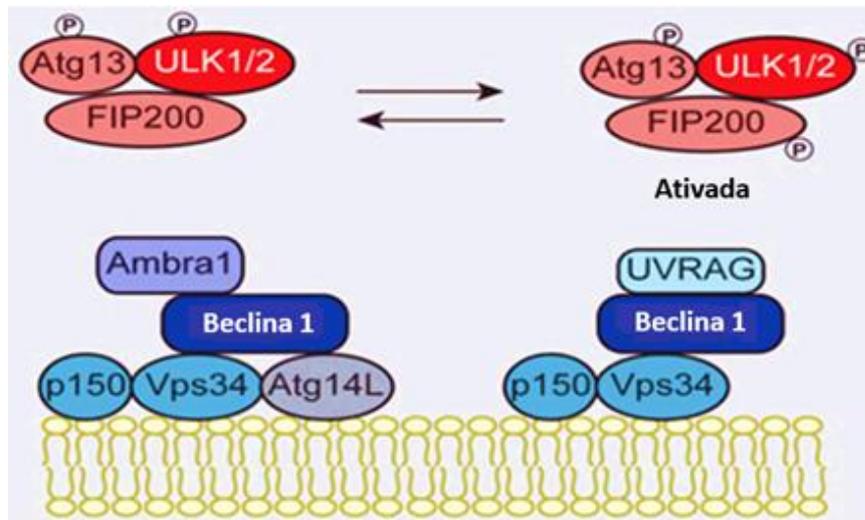
	Proteínas	Características e Funções
Complexo Atg1/ULK	ULK1/2	Ser/Thr proteína cinase; fosforilada por M/TORC1; recrutamento de proteínas Atg ao PAS
	ATG13	Subunidade regulatória através da fosforilação por M/TORC1 e/ou PKA. Ligação entre Atg1 e Atg7
	RB1CC1/FIP200 (homólogo funcional)	Proteína de arcabouço para ULK1/2 e ATG13. Fosforilada por ULK1
	C12orf44/ATG101	Componente do complexo com Atg13 e RB1CC1
Complexo Atg9	ATG2	Interage com ATG18
	ATG9A/B	Proteína transmembrana, direciona membrana ao fagóforo
	WIPI1/2	Proteína ligadora de PtdIns3P
Complexo PtdIns3k	PIK3C3/VPS34	PtdIns 3-cinase
	PIK3R4/VPS15	Ser/Thr proteína cinase
	BECN1	Componentes do complexo PtdIns3K classe I e II
	ATG14	Componente do complexo Ptdins3K classe I
Sistema de conjugação Ubl de Atg8	LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL /1/2	Ubl, conjugada ao fosfolípido PE
	ATG7	Enzima 'E1-like'
	ATG3	Enzima 'E2-like'
	ATG4A/ B/C/D	Enzima desconjugadora, cisteína proteínase
Sistema de conjugação Ubl de Atg12	ATG12	Ubl
	ATG7	Enzima 'E1-like'
	ATG10	Enzima 'E2-like'
	ATG16L1	Interage com Atg5 e Atg12
	ATG5	Conjugada a Atg12

Fonte: modificado de THOMÉ, 2015.

2.4.5 Indução

O processo de indução dá-se através da formação do fagóforo. O início desta etapa envolve um conjunto principal de proteínas tais como a PI3K III (fosfatidilinositol cinase de classe III) também conhecida como Vps34, mAtg6 (beclina 1), p150 (subunidade reguladora da Vps34) e a mAtg14L (figura 3). Estas proteínas são responsáveis pela formação do complexo mAtg6, p150, Vps34 e Atg14L formando fosfatidilinositol-3-fosfato, dando origem ao sítio de nucleação do fagóforo (PAS) local onde se encontram as principais Atg's responsáveis pelo controle do processo autofágico (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013).

Figura 3 – A ativação dos complexos ULK e PI3K III



Fonte: Adaptada de MURROW; DEBNATH, 2013.

O posicionamento do complexo encontra-se sob o controle de outras proteínas denominadas Ulk-1/-2 (mAtg1), mAtg13 e FIP200 (proteína de interação) (MURROW; DEBNATH, 2013). A proteína mTOR, é um regulador da fase de iniciação. mTOR é um inibidor da autofagia quando na forma ativada (fosforilada). Porém, em condições de estresse celular, mTOR é inibida, permitindo a ativação inicial do complexo Ulk através da fosforilação da proteína ULK 1/2 e conseqüentemente ativação das proteínas ATG13 e FIP200, dando início a autofagia (Figura 3). (DERETIC, 2010).

Posteriormente a ativação do complexo ULK, o complexo PI3K III é formado no intuito de produzir fosfatidilinositol 3-fosfato no PAS, resultando no recrutamento de proteínas essenciais para continuação do processo autofágico.

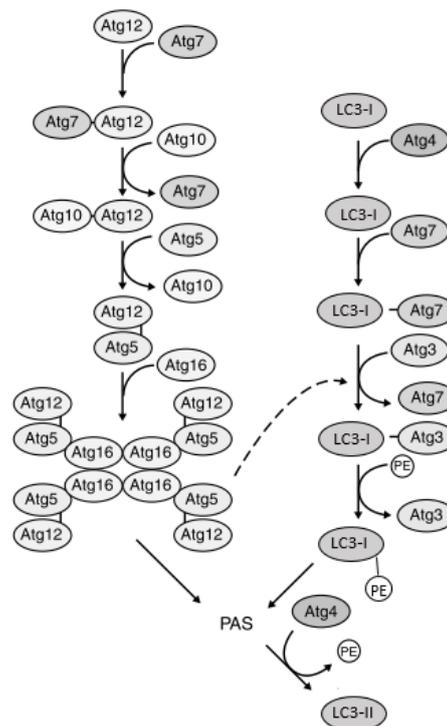
A partir desta etapa, a membrana começa a expandir formando um compartimento duplo que atua incorporando e isolando o substrato a ser degradado. A origem da membrana que forma o fagóforo não é precisa, porém vários estudos sugerem a possibilidade de fontes como, a membrana plasmática, retículo endoplasmático, complexo de Golgi ou mitocôndrias (HAMASAKI et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2012).

2.4.6 Alongamento ou expansão

A expansão da membrana autofágica acontece devido a interação das proteínas Atg12 com Atg7 e Atg10, que por vez, irão atuar como catalisadores para ligação covalente da Atg12 com a Atg5 e adicionalmente uma ligação conjugada não covalente entre Atg5 e uma outra proteína, a Atg16, desta forma, acarretando no surgimento do complexo Atg16L1 (Figura 4). A Atg7 e Atg10, são importantes para o recrutamento de outras proteínas para a membrana, tal como a LC3 (proteína associada a microtúbulos de cadeia leve 3) equivalente a Atg8 (OHSUMI, 2001; SHINTANI et al., 1999).

A proteína LC3 existe em duas formas, a LC3-I (citósol) e a sua derivada proteolítica LC3-II (membrana do fagóforo e autofagossomo) formada através da clivagem da LC3-I pela protease Atg4 que permite sua interação com as proteínas Atg7 e Atg3, conseqüentemente sendo conjugada ao fosfolípido de membrana fosfatidiletanolamina (PE), dando origem a LC3-II, também conhecida como LC3B, desta forma sendo distribuída simetricamente nas membranas interna e externa do autofagossomo. (WANG et al., 2013).

Figura 4 – Formação dos complexos de conjugação Ubiquitin like, Atg16L1 e LC3-II



Devido a suas características específicas de ser a proteína Atg amplamente encontrada em autofagossomos maduros, a LC3 pode normalmente ser quantificada para investigação da presença de autofagia celular (WANG et al., 2013).

A LC3 II também está associada a funções de reconhecimento de substratos a serem incorporados na vesícula autofágica e posteriormente degradados, assim como na estrutura e expansão da membrana do fagóforo e autofagossomo (BARTH; GLICK; MACLEOD, 2010).

Além da LC3, outros substratos da autofagia podem ser avaliados para monitorar fluxo autofágico. A proteína SQSTM1/p62 é seletivamente incorporada nos autofagossomos através de um domínio de ligação a LC3-II e é degradada com a conclusão da autofagia, desta forma, a P62 é inversamente proporcional ao quantitativo de LC3 (BJØRKØY et al., 2005).

Na fase de maturação os autofagossomos movem-se através de microtúbulos por meio do centro organizador dos mesmos, designado de MTOC (“microtubule organizing center”), responsável pela organização de vesículas e organelas com ajuda da proteína motora dineína (RAVIKUMAR et al., 2010).

Os autofagossomos, formados randomicamente no citoplasma, fundem-se com organelas endossomais e lisossomais com atividade lítica sendo denominados a partir de então de autolisossomos. Os autolisossomos são delimitados por uma única membrana que contém produtos degradados de alvos capturados (DERETIC, 2010). Os autofagossomos fundem-se primeiro com endossomos e depois com lisossomos. Essa fusão ocorre devido a diversas proteínas, como Rab7, SNAREs (“soluble NSF attachment protein receptors”), ESCRT (“endosomal sorting complex required for transport”) e proteínas Vps (“vacuolar protein sorting”) classe C. A proteína UVRAG recruta proteínas Vps da classe C e por via dessa interação ativa Rab7, promovendo a fusão com endossomos tardios e lisossomos (RAVIKUMAR et al., 2010).

2.4.7 Regulação

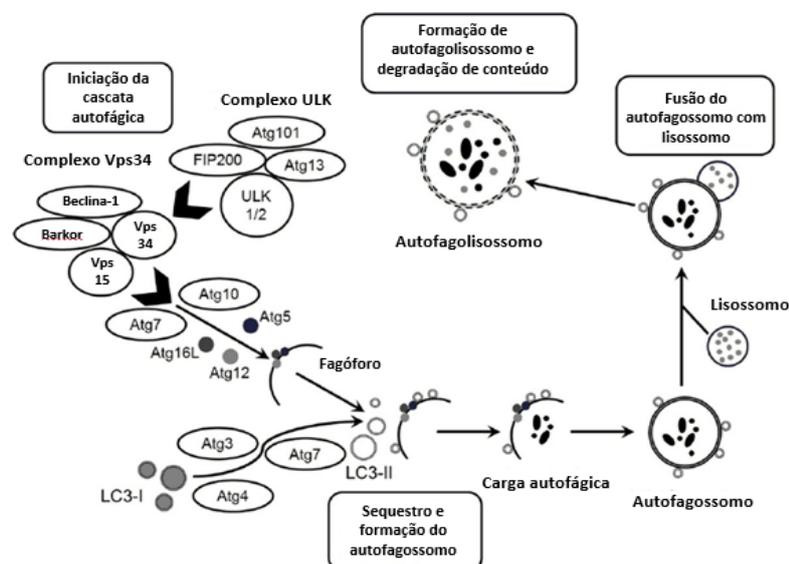
A autofagia é importante para que a célula consiga responder a uma grande variedade de sinais de estresse intra e extracelulares, como por exemplo as infecções. AMPK é a principal cinase sensora dos níveis de energia na célula e responde aos níveis intracelulares de AMP/ATP para regular uma grande variedade de processos

celulares, incluindo autofagia. AMP e ATP possuem efeitos opostos na atividade de AMPK e níveis elevados de AMP promovem a ativação da sua atividade cinase. Quando ativada, em situações de baixos níveis de energia, AMPK pode fosforilar e ativar o complexo TSC1/2, o qual inibe indiretamente a atividade de mTOR, uma das principais proteínas reguladoras da homeostase celular. AMPK pode, também, fosforilar e ativar o ULK1. Em ambos os casos levando a indução da autofagia (ALERS et al., 2012; HARDIE, 2007).

A mTOR, trata-se de uma serina treonina quinase descoberta após observação dos efeitos imunossupressores de um composto isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, mais tarde chamado de rapamicina. O uso de drogas como a rapamicina que interfere no metabolismo celular particularmente por inibição de mTOR já é conhecido há anos e pode ser empregado atualmente em estudos que visem a capacidade de indução autofágica (RAVIKUMAR et al., 2010).

Ficando evidenciado que qualquer distúrbio, inclusive os provocados por infecções virais em algumas dessas proteínas regulatórias que desempenham um papel fundamental para manutenção da homeostase celular, pode desencadear o processo de autofagia (figura 5). A princípio como um mecanismo de defesa da célula (LEVINE, 2005).

Figura 5 – Resumo esquemático da autofagia



Fonte: Adaptada de AKL et al., 2015

2.5 ZIKV E AUTOFAGIA

Estudo recente demonstrou que, semelhante a outros flavivírus como por exemplo o DENV, a infecção por ZIKV em fibroblastos da pele ou células progenitoras neurais humanas induzem arranjos de reação no retículo endoplasmático (RE), resultando na formação de estruturas vesiculares denominadas como pacotes de vesículas, assim como cisternas de RE aumentadas, contendo partículas virais. Estes locais são considerados como ponto de replicação e montagem de RNA viral, respectivamente (CHIRAMEL; BEST, 2017).

A Infecção por vírus Zika pode ser associada à observação de uma grande quantidade de duplas membranas vacuolares intracitoplasmáticas (denominadas como autofagossomos) com presença dos peptídeos do envelope do ZIKV e a proteína marcadora de autofagia LC3 II (BLÁZQUEZ et al., 2014).

Ainda que os mecanismos de infecção de células neurais pelo ZIKV não estejam completamente esclarecidas, pesquisas sugerem a possibilidade do envolvimento da autofagia na via replicativa do vírus, visto que já que existem evidências em outras linhagens celulares como por exemplo em fibroblastos de pele humana que podem presumir tal ação (CAO et al., 2017).

Em estudo realizado com modelos murínicos gravídicos, notou-se que a deficiência de proteínas como as do complexo ATG16L1, relacionada a etapa de expansão da membrana do autofagossomo, revelou uma diminuição da autofagia e conseqüentemente diminuição da infecção placentária pelo ZIKV quando comparado a outro grupo em que não apresentava deficiência de ATG16L1, demonstrando relação entre autofagia e modulação da replicação do vírus (CORTESE et al., 2017).

Cao Bin et al, 2017 em estudo in vivo, pôde avaliar a replicação do ZIKV associada ao processo de autofagia em células trofoblásticas, utilizando para isso um inibidor para autofagia, onde evidenciou-se um declínio da carga viral nos modelos em que foi utilizado o inibidor, revelando uma correlação entre maior replicação viral e autofagia.

Nicholas et al. 2010, propôs um modelo em que a infecção por flavivírus (no caso o DENV) é capaz de promover a indução autofágica e como consequência induzir uma alteração no metabolismo lipídico celular, evidenciado pelo esgotamento

de lojas de triglicerídios em gotículas lipídicas, resultando na liberação de ácidos graxos livres que são importados para mitocôndria, onde são submetidos a *β*-oxidação, gerando ATP e desta forma aumentando os numerosos mecanismos de replicação do vírus. Pelo fato do ZIKV possuir características filogenéticas e estruturais semelhantes ao DENV, tal modelo poderia aplicar-se ao ZIKV elucidando seu mecanismo de replicação através da autofagia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do mecanismo de autofagia nas alterações na capacidade replicativa do ZIKV em células de linhagem glial.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar o nível de carga viral do ZIKV em células gliais da linhagem U87-MG infectadas pelo ZIKV durante a presença e ausência de indutor de autofagia.
- Avaliar a indução autofágica na presença e ausência de indutor autofágico e infecção pelo ZIKV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 VÍRUS

O ZIKV BR (Recife / Brasil, ZIKV PE / 243, Nº de acesso: KX197192.1, gentilmente cedido pelo Dr. Lindomar José Pena, Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Recife, Brasil) foi isolado de uma paciente apresentando sintomas clássicos de infecção por ZIKV. O vírus foi propagado em células C6/36. Resumidamente, as células foram infectadas com ZIKV a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 e incubadas a 37 °C. Após 1 h, o inóculo foi removido e substituído por meio de crescimento Leibovitz, suplementado com 2% de FBS. Após 4 a 6 dias, o meio condicionado foi colhido, centrifugado a 300 xg e filtrado estéril para remover as células e detritos celulares. Os estoques de vírus foram armazenados a -80 °C.

4.2 CULTIVO DE CÉLULAS DA LINHAGEM U87-MG

Às células foram obtidas através de doação pelo Prof. S. Gustincich (Departamento de Neurobiologia, Escola Internacional de Estudos Avançados - Trieste, Itália), foram cultivadas em frascos T75 (75 cm²) com meio MEM (Meio Mínimo Essencial Eagle, Sigma Aldrich) contendo 10% de SBF (Sigma Aldrich), acrescentado de penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich) e solução de 2mmol/L de glutamina (Sigma Aldrich). Igualmente ao cultivo das células vero, as células da linhagem U87-MG após subcultivo realizado a partir de subconfluência de 80% foram tratadas com lavagem prévia com 3 ml de solução tampão fosfato-salina (PBS), antecedendo a aplicação de 3 ml de tripsina durante 3 minutos para antiaderência da monocamada celular. Para neutralização da tripsina foi utilizado 6 ml de MEM, sendo a solução contendo às células, transferida para tubo falcon de 15 ml e posterior centrifugação a uma força G de 300x durante 5 minutos. Após sedimentação celular com formação de pellet, o mesmo foi ressuspensionado em 2 ml para desagregação celular e passagem das células para novos frascos com MEM e armazenamento em estufa à 37 C° e 5% de CO₂.

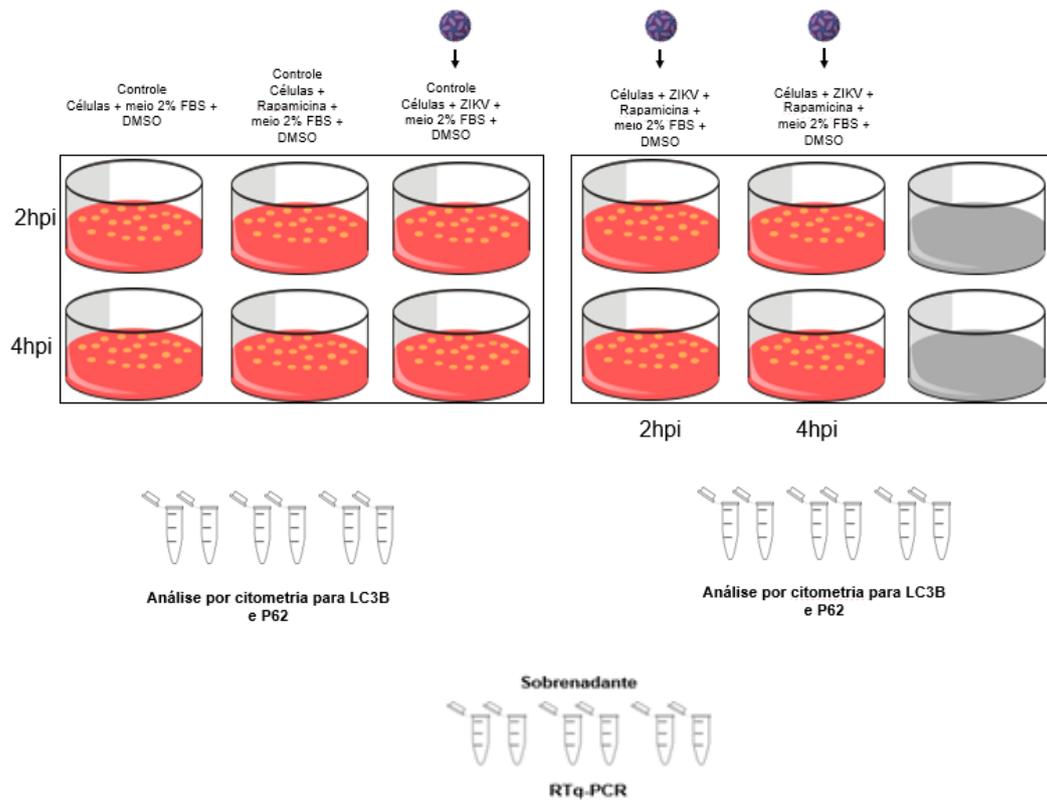
4.3 TITULAÇÃO VIRAL

A titulação viral foi determinada por ensaio de placa realizado em células Vero. Estoques de vírus ou amostras foram diluídos em série e adsorvidos em monocamadas confluentes. Após 1 hora, o inóculo foi removido e as células foram cobertas com meio semi-sólido constituído por alfa-MEM (GIBCO) contendo 1% de carboximetilcelulose (Sigma Aldrich) e 1% de FBS (GIBCO). As células foram ainda incubadas durante 5 dias quando as células foram fixadas em formaldeído a 4%. As células foram coradas com violeta de cristal a 1% em etanol a 20% para visualização da placa. Os títulos foram expressos como unidades formadoras de placa (PFU) por mililitro.

4.4 DESENHO DO ESTUDO

A análise realizada no respectivo estudo, consiste na elaboração de um grupo amostral para avaliação da influência da autofagia celular frente a infecção provocada pelo ZIKV nas células de linhagem neuroglial U87-MG, durante os períodos de 2 e 4 horas de pós infecção (hpi) (Figura 7). A análise ocorreu através da avaliação de cinco amostras organizadas como: controle de células não infectadas, controle de células + rapamicina (abcam, 120224) indutor autofágico, controle com células + ZIKV e mais duas amostras contendo células infectadas + rapamicina, perfazendo um grupo amostral de três controles e duas amostras experimentais (figura 6). As amostras foram dispostas em placas de seis poços e posteriormente ao período de 24 horas foram infectadas com o vírus em um volume de solução de 1 ml e após o período de adsorção de uma hora com leve agitação a cada 15 minutos, foi inserido o indutor de autofagia. As amostras foram avaliadas através de análise em duplicata nas amostras infectadas para investigação dos níveis de carga viral por RT-qPCR, verificadas nos diferentes momentos de pós-infecção pré-estabelecidos.

Figura 6 - Desenho do estudo apresentando o esquema metodológico experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para as amostras o número de células utilizadas foi de 2×10^5 por poço, seguidos da infecção viral com a utilização de um MOI 1,0 e a utilização da rapamicina em uma concentração de 40 nM utilizando como veículo de diluição o dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração final de 0,002%. Pelo fato do DMSO ser uma substância tóxica em determinadas concentrações, expusemos todas as amostras a mesma substância para evitar viés durante a análise dos dados. Após infecção e período de adsorção todos os poços foram completados a um volume de 2 ml com MEM suplementado a 2% de FBS.

4.5 DETECÇÃO DA AUTOFAGIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A primeira marcação ocorreu logo após preparação das amostras através de lavagem com PBS seguida da adição de tripsina e neutralização da mesma com a utilização de MEM. Para centrifugação, as soluções contendo as células, foram

transferidas para tubos do tipo falcon de 15 ml referentes a cada amostra e posteriormente centrifugadas a uma força g de 300x por 5 minutos, as células foram lavadas 2x com PBS com 3% de albumina sérica bovina (BSA) e fixadas com formolaldeído a 1%, em seguida foram permeabilizadas com Tween-20 por 15 minutos, lavadas novamente com solução contendo PBS e 0,1% do agente permeabilizante, incubadas com os anticorpos primários anti-LC3B abcam51520 (coelho anti-LC3B) e anti-SQSTM1/P62 abcam56416 (camundongo anti-SQSTM1/P62) nas diluições de 1:200. As amostras foram lavadas novamente com PBS/BSA 3% e incubadas após nova lavagem com os anticorpos secundários conjugados abcam150077 (cabra anti-coelho conjugado com Alexa Fluor® 488) e abcam150119 (cabra anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor® 647).

A análise por citometria de fluxo foi realizada através do citômetro BD aCuri™ C6 configurado com 2 lasers (azul e vermelho) e capaz de ler até 6 parâmetros de forma simultânea (4 cores, SSC e FSC). No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pelos anticorpos utilizados. Foram capturados 1000 eventos em velocidade média.

4.6 DETECÇÃO SEMI - QUANTITATIVA POR RT-QPCR

Para confirmar a infecção por ZIKV, o sobrenadante de células U87-MG infectadas com ZIKV foram analisados por RT-qPCR em única etapa através da plataforma em tempo real (ABI 7500, Applied Biosystem). Resumidamente, o RNA viral foi isolado por um kit comercial seguindo as instruções do fabricante (QIAamp® Viral RNA). Todas as reações foram montados em um volume final de 15 µL com 1× mix PrimeTime (Integrated DNA Technologies) contendo ambos os primers (Forward e Reverse) (LANCIOTTI et al., 2008) e sonda e 7,5 µL de Mistura principal TaqMan (Applied Biosystems) usando o seguinte algoritmo de ciclagem: 60 ° C por 30 min, 95 ° C por 10 min, seguido por 45 ciclos de 95 ° C por 15 s e 60 ° C por 1 min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A autofagia celular consiste em um processo de degradação de estruturas intracelulares e sua remoção através da via fagolisossomal funcionando como um evento importante para a manutenção da homeostase em células eucarióticas. Dentre outras funções conhecidas, o processo autofágico atua como fonte alternativa de nutrientes no estresse por ausência nutricional, além de participar no controle de estoques de lipídios intracelulares e na tentativa de controle a determinados patógenos (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013; YORIMITSU; KLIONSKY, 2005).

Embora os hospedeiros tenham desenvolvido autofagia para manter a homeostase celular e a infecção limitada por patógenos, alguns patógenos, como os flavivírus, usurpam as vias de autofagia celular para beneficiar seus ciclos de vida (HAMEL et al., 2015; LIANG et al., 2016).

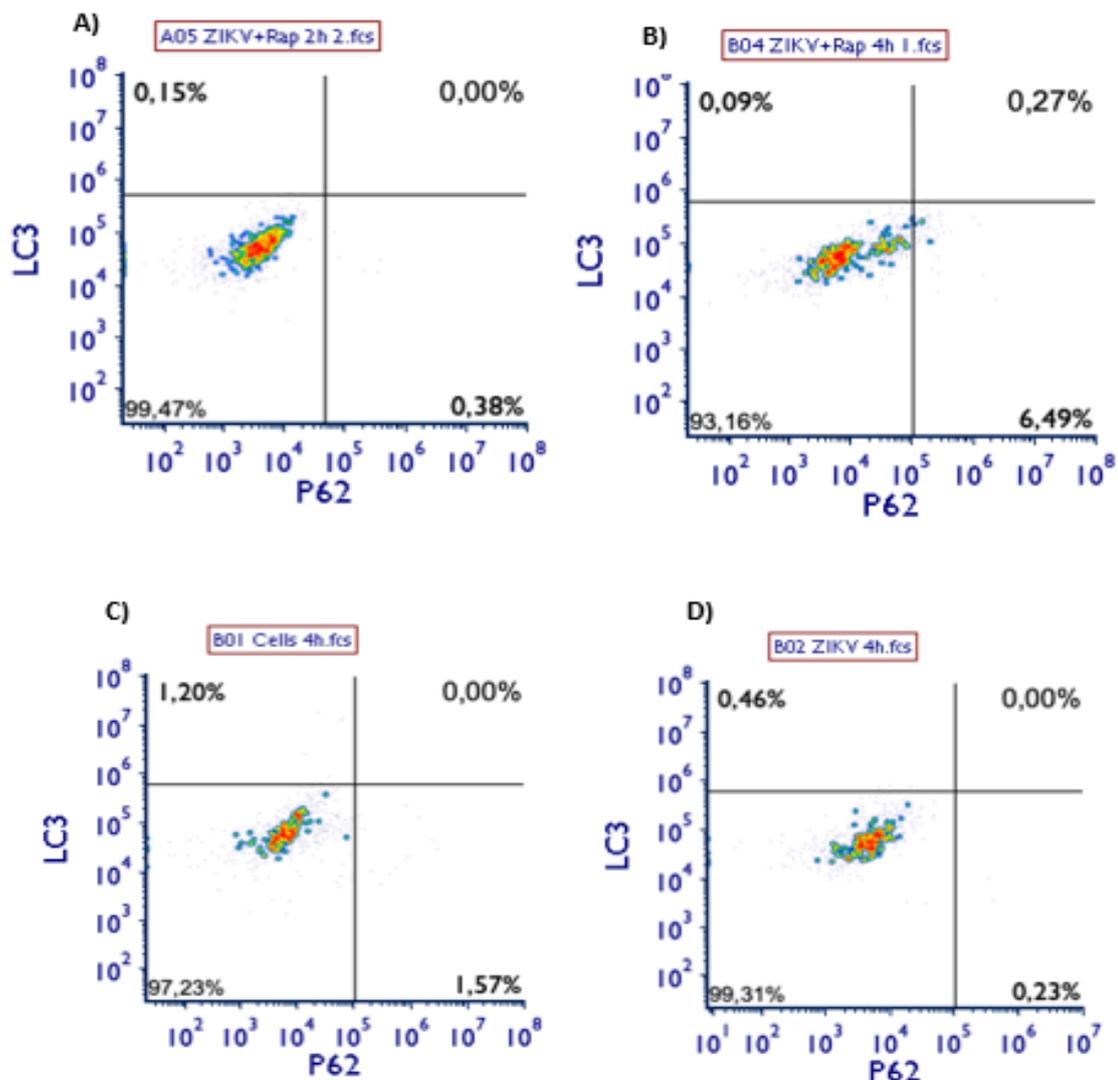
Na presente dissertação, a participação da autofagia frente a infecção pelo ZIKV, foi avaliada em diferentes amostras utilizando o modelo de linhagem celular U87-MG (células de glioblastoma). De acordo com Zhang (2017) o ZIKV possui tropismo por tecidos nervosos, em que a infecção pelo zika vírus é associada à observação de muitos vacúolos intracitoplasmáticos de membrana dupla (autofagossomos).

Em estudo realizado por Liang et al., 2016 foi mostrado que as proteínas não estruturais NS4A e NS4B presentes no ZIKV são capazes de suprimir a via de sinalização AKT-mTOR, principal responsável por controlar a estimulação da autofagia em células eucarióticas, desta forma, induzindo a autofagia. Mirzaa et al., 2013 reforça que alterações na via de sinalização AKT-mTOR são críticas não somente pelo controle da autofagia, mas também para o desenvolvimento cortical, podendo ocasionar microcefalia quando inibida de forma permanente.

Após a o tratamento com rapamicina e infecção pelo ZIKV, as células foram avaliadas quanto ao seu potencial autofágico pela citometria de fluxo, como pode ser observado na figura 6, embora tenha apresentado um baixo número de eventos, mostrou maior marcação com relação a autofagia nos testes tratados com o indutor autofágico, mostrando que houve indução autofágica pela positividade de marcação para as proteínas LC3B e SQSTM/P62, com maior marcação para p62 no período de

4 hpi (Painel B). O restante das amostras controle não puderam servir de parâmetro devido ao baixo número de células viáveis no momento da análise. Os campos C e D na figura, representam respectivamente a amostra controle contendo apenas células não tratadas e amostra infectada, porém não tratada com indutor de autofagia.

Figura 6 – Análise por citometria de fluxo para expressão das proteínas LC3B e SQSTM/p62

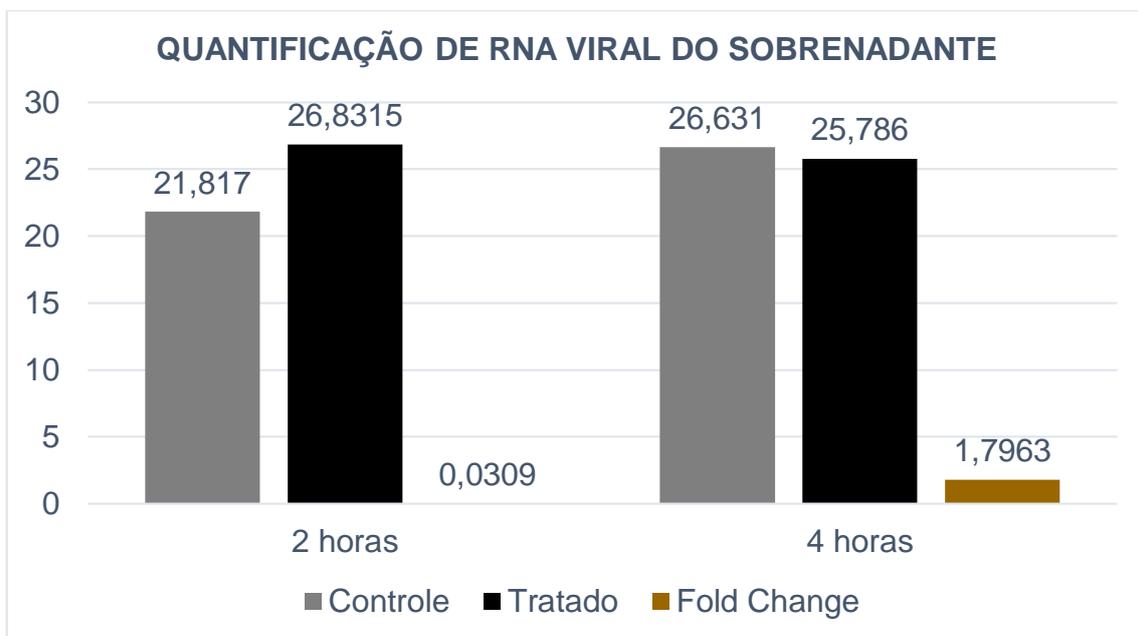


Fonte: Elaborado pelo autor.

Em nosso estudo a análise por RT-qPCR, mostrou que na amostra infectada pelo ZIKV avaliada no período de 4 hpi, a rapamicina foi capaz de provocar indução

autofágica, sendo evidenciado pela elevação dos níveis da marcação celular para as proteínas de autofagia, principalmente SQSTM/p62 na citometria de fluxo (Figura 6) sugerindo um aumento da carga viral do ZIKV em comparação ao grupo controle infectado sem indução autofágica, com melhor resposta no período de 4 hpi (Gráfico 1). Resultados semelhantes com relação ao aumento da carga viral do ZIKV através do uso da rapamicina foram encontrados também nos estudo de Delvecchio e Liang et al. 2016 onde os mesmos utilizaram várias outras linhagens celulares na infecção pelo ZIKV.

Gráfico 1 - Análise semi-quantitativa de carga viral por RT-qPCR



Fonte: Dados da pesquisa

A comparação entre as amostras tratadas e analisadas no período de 2 e 4 hpi apresentou um *fold-change* de 2,06, enquanto a mesma comparação entre os controles apresentou um *fold-change* de 0,35.

No período de 2 hpi não houve aumento de carga viral em comparação ao grupo controle, reforçando que a rapamicina teve sua melhor eficácia na indução autofágica durante as primeiras 4 horas de exposição às células U87-MG.

A rapamicina é uma lactona macrocíclica originada da bactéria do solo *Streptomyces hygroscopicus*, conhecida como uma droga antibiótica e

imunossupressora que induz o fluxo autofágico pela inibição da atividade da mTOR (RAVIKUMAR et al., 2010). Segundo Zhou et al., 2015 a indução do fluxo autofágico e a degradação autofágica mediada por lisossomos através da rapamicina se mostra benéfica por prevenir ou atenuar doenças neurodegenerativas.

A mTOR como já dito anteriormente orchestra numerosos processos celulares em organismos vivos, regulando a homeostase, a síntese de proteínas, a transcrição, a autofagia, o metabolismo, a função cerebral e o desenvolvimento (Thoreen, 2017). A descoberta de que a regulação das vias de sinalização da mTOR se correlacionou com cargas virais persistentes sugere que a infecção pelo ZIKV pode influenciar diretamente a maquinaria mTOR, promovendo a sobrevivência das células infectadas. Além disso, a sinalização mTOR tem mostrado um papel fundamental no desenvolvimento neurológico, incluindo a proliferação de células-tronco neurais, o desenvolvimento de circuitos neuronais, a plasticidade e funções mais complexas (AID et al., 2017).

A atuação da indução autofágica em nosso estudo representada por uma discreta positividade para os marcadores de autofagia na citometria de fluxo e proliferação viral não tão expressiva, porém notável, pode ser justificada pela resposta a interação da célula U87-MG com a rapamicina, visto que em estudo realizado por Barth et al. 2010, a mesma indaga que, o uso de rapamicina para induzir autofagia (através da inibição de TORC1) pode ter efeitos diferentes, dependendo do tipo de célula e atividade relativa de TORC2 e outras moléculas sinalizadoras nesta via. Corroborando com a indagação de Bath et al. 2010, um estudo realizado por Arcella et al., 2013 no qual a mesma utilizou o mesmo tipo de linhagem celular utilizada em nosso estudo, mostrou que a rapamicina foi capaz de inibir a proliferação celular e também induziu as células a morte.

Contrao o estudo de Arcella, Thomé et al., 2016 ao testar um novo marcador para autofagia, utilizou também células U87-MG com uma dose de rapamicina de 200 nM, muito superior a utilizada em nosso experimento pôde observar a indução autofágica no período de 24 horas de tratamento sem problemas relacionados a indução de morte celular pela rapamicina.

Diante de todas as informações obtidas podemos pontuar como limitação do estudo que o uso das células U87-MG como modelo para avaliação autofágica frente

a infecção pelo ZIKV mostrou-se de difícil análise, visto que as células foram mais sensíveis na tolerância a reagentes para análise da autofagia, mesmo em doses consideradas seguras no que se diz respeito a ausência de alterações citopáticas.

Sugerimos que testemos a citotoxicidade real da Rapamicina, além do uso de outros modelos celulares neuronais que suportem outras drogas de testes que influenciam na atividade da autofagia possam ser avaliados com relação as implicações no favorecimento da replicação viral.

Com base nos achados do atual estudo, ressaltamos como perspectiva o incremento de outros reagentes específicos para análise autofágica em diferentes modelos celulares, assim como a comparação entre diferentes cepas virais do zika no contexto da autofagia.

6 CONCLUSÃO

O indutor autofágico rapamicina apresentou-se como um acentuador da replicação viral nas quatro primeiras horas de pós-infecção em células de origem glial, sendo evidenciado pelo aumento da carga viral do ZIKV.

REFERÊNCIAS

- AID, Malika et al. Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**, [s. l.], v. 169, n. 4, p. 610–620, 2017.
- AKL, Mohamed R. et al. Araguspongine C Induces Autophagic Death in Breast Cancer Cells through Suppression of c-Met and HER2 Receptor Tyrosine Kinase Signaling. **Marine drugs**, [s. l.], v. 13, p. 288–311, 2015.
- ALERS, S. et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 2–11, 2012. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.06159-11>>
- ARCELLA, Antonietta et al. Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma. **Brain Research**, [s. l.], v. 1495, p. 37–51, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.044>>
- ASIF, Arun et al. Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. **Viral immunology**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. vim.2017.0046, 2017. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2017.0046>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29028178>>
- BARLETTO, Jéssica; SOUSA BARROS, De. Quantificação de moléculas inflamatórias e anti- inflamatórias em indivíduos infectados pelo zika vírus na fase aguda e convalescente. 2017. **Pontifícia Universidade Católica De Goiás**, [s. l.], 2017.
- BARTH, Sandra; GLICK, Danielle; MACLEOD, Kay F. Autophagy: Assays and artifacts. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 221, n. 2, p. 117–124, 2010.
- BASARAB, Marina et al. Vírus da Zika. **British Medical Journal**, [s. l.], p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.i1049>>
- BJØRKØY, Geir et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 171, n. 4, p. 603–614, 2005.
- BLÁZQUEZ, Ana Belén et al. Stress responses in flavivirus-infected cells: Activation of unfolded protein response and autophagy. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. JUN, 2014.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19. [s. l.], v. 47, n. 6, p. 7, 2016.
- BRASIL. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS. 1ª ed. **Brasília: Secretaria de vigilância em saúde**, 2017. a.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 28/2017, [s. l.], v. 48, n. N°24, 2017. b.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim

Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 43 de 2018, [s. l.], v. 49, p. 1–14, 2018.

CALVET, Guilherme et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CAO, Bin et al. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 214, n. 8, p. 2303–2313, 2017. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20170957>>

CHANG, Christopher et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 68, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>>

CHIRAMEL, Abhilash I.; BEST, Sonja M. Role of Autophagy in Zika Virus Infection and Pathogenesis. **Virus Research**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170217304677>>

CIPRIANO, Rosangela; MONTEIRO, Carolina Cipriano. Relato sobre o Zika vírus no Brasil A report about Zika virus in Brazil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, [s. l.], v. 6, p. 4–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17058/reci.v6i1.6959%09>>

CONCI, Denis; GOES, Icaro; LUIZ, Erik. Infecção pelo zika vírus e seu nexos causal com casos de microcefalia no brasil: uma revisão da literatura. **Anuário Pesquisa e Extensão**, [s. l.], v. 2, p. 17, 2017.

CORTESE, Mirko et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell Reports**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 2113–2123, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>>

DE M. CAMPOS, Renata et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 77, p. 69–70, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.009>>

DELVECCHIO, Rodrigo et al. Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. **Viruses**, [s. l.], v. 8, p. 1–15, 2016.

DERETIC, Vojo. Autophagy in infection. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 252–262, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.009>>

DERETIC, Vojo; SAITOH, Tatsuya; AKIRA, Shizuo. Autophagy in infection, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 722–737, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3532>>

DING, Li et al. Guillain-Barré syndrome following bacterial meningitis : a case report and literature review. **BMC Neurology**, [s. l.], p. 1–5, 2018.

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102017000100606&lng=en&tlng=en>

DUFFY, MR et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 360, p. 2536–2543, 2009.

ECDC. Rapid Risk Assessment Zika virus disease epidemic Main conclusions and options for response. **Stockholm**. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-zika-virus-disease-epidemic-potential-association-4>>.

EICKMANN, Sophie Helena et al. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 1–3, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2016000700601&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>

G. W. A. DICK, M.D., B.SC., M.R.C.P. (EDIN.), M. P. H. (Johns Hopkins). Epidemiological Notes on Some Viruses Isolated in Uganda. **Public Health**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 119, 1952. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033350627800788>>

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, [s. l.], p. e201796697, 2017. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emboj.201796697>>

GUBLER, Duane J.; G, Kuno; L, Markoff. Flaviviruses. 5. ed. Philadelphia, **PA: Fields virology**, 2007.

HADDOW, A. J. et al. Twelve Isolations of Zika Virus From Aedes (Stegomyia) Africanus (Theobald) Taken in and Above a Uganda Forest. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 31, n. 1961, p. 57–69, 1964.

HAMASAKI, Maho et al. Autophagosomes form at ER–mitochondria contact sites. **Nature**, [s. l.], v. 495, n. 7441, p. 389–393, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11910>>

HAMEL, Rodolphe et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00354-15>>

HARDIE, D. Grahame. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 774–785, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2249>>

HEATON, Nicholas S.; RANDALL, Glenn. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 422–432, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>>

JUNIOR, Vitor Laerte Pinto et al. Vírus Zika : Revisão para Clínicos Zika Virus : A Review to Clinicians. **Revista Científica da Ordem dos Médicos**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 760–765, 2015. Disponível em: <<https://www.minsaude.gov.cv/index.php/documentosite/zika-1/311-virus-zika-revisao-para-clinicos/file>>

KAM, Yiu-Wing et al. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. **JCI Insight**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/92428>>

- KAUSHIK, Susmita; CUERVO, Ana Maria. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 407–417, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.006>>
- KHAKPOOR, Atefeh et al. A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1093–1103, 2009.
- KINDHAUSER, Mary Kay et al. Zika : the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bull World Health Organ** [s. l.], n. February, p. 675–686, 2016.
- LANCIOTTI, Robert S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic , Yap State. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 8, 2008.
- LEVINE, Beth. Eating Oneself and Uninvited Guests : Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense. **Cell**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 159–162, 2005.
- LIANG, Qiming et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>>
- LINDENBACH, B.; THIEL, H. J.; RICE, C. Flaviviridae: The 693 Viruses and Their Replication. **Field**, [s. l.], v. 694, p. 1001–1152, 2007.
- LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48 de 2018. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/18/2018-064.pdf>>. Acesso em: 24 dez. 2018.
- MIRZAA, Ghayda M.; RIVIÈRE, Jean Baptiste; DOBYNS, William B. Megalencephaly Syndromes and Activating Mutations in the PI3K - AKT Pathway : MPPH and MCAP. **American Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 130, n. April, p. 122–130, 2013.
- MORRISON, Thomas E.; DIAMOND, Michael S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 91, n. 8, p. JVI.00009-17, 2017. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00009-17>>
- MOUREAU, Gregory et al. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2015.
- MURROW, Lyndsay; DEBNATH, Jayanta. Autophagy As A Stress Response And Quality Control Mechanism—Implications for Cell Injury and Human Disease. **Annual review of pathology**, [s. l.], n. 2, p. 105–137, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971121/>>
- NORONHA, Lucia De et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v.

111, n. 5, p. 287–293, 2016.

NUNES, Magda Lahorgue et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 230–240, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.009>>

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia , December 2013. **Euro Surveill** [s. l.], v. 1, n. December 2013, p. 7–9, 2014.

OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 211–216, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11265251>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. **Implications for public health in the Americas**. 2015. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf>>.

PANYASRIVANIT, Mingkwan et al. Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. **Virology**, [s. l.], v. 418, n. 1, p. 74–84, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.07.010>>

PARZYCH, Katherine R.; KLIONSKY, Daniel J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 460–473, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5371>>

PINGEN, Marieke et al. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1455–1469, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.002>>

PLOURDE, Anna R.; BLOCH, Evan M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases** [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

PRATA-BARBOSA, Arnaldo et al. Effects of Zika infection on growth. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jped.2018.10.016>>

RAVIKUMAR, Brinda et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, [s. l.], p. 1383–1435, 2010.

RUSSEL, Kate et al. Male-to-Female Sexual Transmission of Zika Virus — United States, January–April 2016. **Clinical Infectious Disease**, [s. l.], v. 64, n. April, p. 1–13, 2016.

SCHULER-FACCINI, Lavinia et al. Possível associação entre a infecção pelo vírus zika e a microcefalia — Brasil, 2015. **Weekly**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SHINTANI, Takahiro et al. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 18, n. 19, p. 5234–5241, 1999.

SLAVOV, S. N. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v.

49, n. 5, p. 1–11, 2016.

SMIT, Jolanda M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.

TATTEVIN, P. Dengue, chikungunya: Deux arboviroses emergentes. **Journal des Anti-Infectieux**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 78–88, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2012.04.001>>

THOME, Marcos P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, [s. l.], n. 129, p. 4622–4632, 2016.

THOMÉ, MARCOS PAULO. Análise de Autofagia Pela Razão de Fluorescência do Marcador Laranja de Acridina. 2015. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, [s. l.], 2015.

VALLE, Denise; NACIF PIMENTA, Denise; AGUIAR, Raquel. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S167949742016000200419&scielo=S2237-96222016000200419>

WANG, Liang et al. LC3 fluorescent puncta in autophagosomes or in protein aggregates can be distinguished by FRAP analysis in living cells. **Autophagy**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 756–769, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Arboviruses and human disease. **WHO Technical Report Series**, GENEVA, n. 369, p. 84, 1967. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40664/WHO_TRS_369.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

YAMAMOTO, Hayashi et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 198, n. 2, p. 219–233, 2012.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*, **Nature**, [s. l.], v. 12, p. 1542–1552, 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4401765>>

ZHANG, Zhong-Wei; LI, Zi-Lin; YUAN, Shu. The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. January, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2016.00206/full>>

ZHOU, Cuihong et al. Autophagy Monitoring autophagic flux by an improved tandem reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. **Autophagy**, [s. l.], p. 37–41, 2015.