

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Francielly Cristina Machado

**Análise da expressão de miRNAs em células humanas de próstata  
infectadas com o Zika vírus**

São José do Rio Preto  
2019

Francielly Cristina Machado

**Análise da expressão de miRNAs em células humanas de próstata  
infectadas com o Zika vírus**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/09197-2  
CNPq

Orientador: Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki  
Co-orientador: Profa. Dra. Paula Rahal  
Profa. Dra. Cíntia Bittar Oliva

São José do Rio Preto  
2019

M149a	<p>Machado, Francielly Cristina</p> <p>Análise da expressão de miRNAs em células humanas de próstata infectadas com o Zika vírus. / Francielly Cristina Machado. -- São José do Rio Preto, 2019</p> <p>86 f. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Marília de Freitas Calmon Saiki</p> <p>1. Genética humana. 2. Virologia. 3. Zika vírus. 4. MicroRNAs. 5. Próstata. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Francielly Cristina Machado

**Análise da expressão de miRNAs em células humanas de próstata infectadas  
com Zika vírus**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/09197-2  
CNPq

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Profa. Dra. Ana Elizabete Silva  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo  
UNICAMP - Campinas

São José do Rio Preto  
28 de fevereiro de 2019

*Dedico este trabalho à minha família,  
Anjos de Deus em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus pelo dom da vida, pela graça de sua benção em cada momento dessa caminhada e pelo Seu amparo nos momentos difíceis. Agradeço à Deus pela graça do aprendizado, amizade e perseverança que marcaram o caminho pela qual trilhei até esse momento.

À minha orientadora Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki, que desde a minha iniciação científica tem me orientado, aconselhado e ensinado. Sou grata pela paciência em todos os momentos, pela dedicação em transmitir os seus conhecimentos e pela confiança em meu trabalho. Sou grata por todas as conversas, científicas ou não, que me incentivaram ao longo das trajetórias, acadêmica e pessoal.

À minha co-orientadora, Dra. Cíntia Bittar Oliva, por ensinar pacientemente todas as técnicas científicas, por sempre estar disponível para discutir as dúvidas e por incentivar o pensamento lógico e crítico. Sou grata pela sua grande contribuição em despertar em mim o prazer pela virologia. Sou grata por todo o apoio em superar as adversidades acadêmicas e pessoais.

À minha co-orientadora, Dra. Paula Rahal, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica. Sou grata pelos conselhos acerca da vida acadêmica e pessoal, pela compreensão das dificuldades e confiança ao longo dos anos.

À minha família, luz da minha vida e razão da minha felicidade. Sou grata por toda a dedicação, amor, carinho e principalmente paciência comigo ao longo dessa trajetória. Agradeço imensamente cada gesto, palavra, pensamento e oração, que foram e são a base da minha vida. Sou grata por cada membro, que de perto ou longe zelam pelas minhas conquistas e bem-estar!

Ao meu namorado, Guilherme, meu companheiro dos estudos e da vida. Sou grata por cada passo que demos juntos nessa caminhada, um sempre apoiando o outro. Agradeço pelo companheirismo em todos os momentos, pelo cuidado, amor, paciência e incentivo ao longo dos anos, juntos. Sou grata por todo crescimento que nossa relação me proporciona, pela benção que é tê-lo em minha vida, pelos planos do nosso futuro e pela pureza do nosso amor, que revela o futuro brilhante e feliz que nos espera!

Ao meu amigo, Kawan Carvalho Martins, por todos os momentos compartilhados, pelas risadas dadas e apoio ao longo dos anos. Sou grata por cada momento de descontração, pela amizade e confiança que se fortalecem conforme os anos passam, e demonstram a importância que tem para nós.

Às minhas amigas, Tamara Carvalho e Maria Letícia Duarte Lima, que foram essenciais durante esse mestrado. Sou grata por todos os momentos compartilhados no laboratório, pelas conversas, risadas, cantorias, brincadeiras, paciência, discussões acadêmicas e ajuda em experimentos. A companhia de vocês fez do laboratório uma segunda casa, tornando cada momento vivido lá mais leve e feliz. Irei sentir saudade desses momentos!

A todos os amigos do laboratório, Dayla, Bianca, Rafael, Igor, Ricardo, B1, B2, Tamara, Marilê, Tairine, Ágata, Ana, Lucas, Guilherme, Nayara, Patrícia, Pâmela, Lenira e Paola por todos os momentos compartilhados, gargalhadas e cumplicidade. Sou grata por tudo o que aprendi e evolui com a nossa convivência, levarei cada um de vocês em meu coração.

Aos professores, que sempre constituíram, e sempre constituirão o caminho do aprendizado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (número do processo: 2017/09197-2) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pelo apoio financeiro.



*“Science is light. Light is precious in a world so dark. Begin at the beginning. Make some light”  
(Ciência é luz. A luz é preciosa em um mundo tão sombrio. Comece do começo. Faça alguma  
luz). Adaptado de Kate DiCamillo, The tale of Despereaux.*

## RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um vírus do gênero *Flavivirus*. Em humanos, o modo de transmissão mais comum é através da picada do mosquito *Aedes aegypti*. Entretanto, evidências recentes têm sugerido a transmissão sexual do ZIKV. Embora alguns estudos preconizem o testículo e a próstata como os principais órgãos que colaboram nessa forma de transmissão, pouco se sabe sobre quais tipos celulares destes tecidos são mais suscetíveis a esse vírus. Além disso, a infecção com linhagens distintas do ZIKV em modelos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que a resposta do hospedeiro à infecção é cepa-dependente. Descobertas recentes indicam que esse vírus desregula o perfil de miRNAs celulares e que esse é um importante evento ao longo da infecção. Nesse estudo, avaliamos a suscetibilidade, a permissividade e o perfil de miRNAs celulares de células humanas epiteliais prostáticas (PNT1A) à infecção por duas diferentes cepas do ZIKV, uma cepa africana clássica, MR766 (ZIKV<sup>MR766</sup>) e uma circulante no Brasil, ZIKV<sup>BR</sup>. Para isso, células PNT1A foram infectadas com as cepas do ZIKV e submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta para a proteína do envelope viral; foram monitoradas quanto à produção de partículas virais infecciosas e cópias de RNA viral por ensaio de formação de placas e qPCR, respectivamente e analisou-se o perfil de miRNAs celulares por *PCR array*. Os resultados mostraram que células prostáticas humanas foram suscetíveis e permissivas à infecção pelo ZIKV e não apresentaram nenhuma imposição quanto a infecção por linhagens distintas desse vírus. As cepas testadas não diferiram quanto à cinética de replicação em células de próstata, mas diferiram quanto à modulação da expressão de miRNAs celulares. Após a infecção, 16 miRNAs celulares foram modulados em células de próstata, um pequeno grupo de 6 miRNAs foram modulados por ambas as cepas, enquanto um grupo de 10 miRNAs foram modulados exclusivamente pelo ZIKV<sup>BR</sup>. Análises *in silico* identificaram que o grupo exclusivo de miRNAs regulados na infecção pela cepa brasileira do ZIKV pode regular genes e vias associadas a inflamação, imunidade, sobrevivência celular e proliferação celular. Nossos resultados indicam que a próstata pode ter um importante papel na transmissão sexual do ZIKV e destaca que cepas diferentes do vírus Zika podem induzir uma expressão diferencial de miRNAs celulares, a qual pode influenciar nas diferenças fisiopatológicas após infecção por diferentes cepas.

**Palavras chaves:** Próstata. Transmissão sexual. miRNAs. Cepa Brasileira do Zika vírus. Cepa MR766. Zika vírus.

## ABSTRACT

*Zika virus* (ZIKV) is a virus from the *Flavivirus* genus. In humans this virus is transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes. However, recent evidences indicate the occurrence of sexual transmission. Although some studies have indicated testes and prostate as the main organs that collaborate in this transmission, little is known about which cell types in these tissues are more susceptible to this virus. In addition, infection with distinct ZIKV strains in some models *in vitro* and *in vivo* has demonstrated that the host's response to infection is strain-dependent. Recent findings suggest that this virus deregulates host miRNA profile and that this is an important event throughout the course of the infection. Herein, we evaluated the susceptibility, the permissiveness and the cellular miRNA profile of human prostatic epithelial cells (PNT1A) to two different strains of ZIKV, a classical African strain, MR766 (ZIKV<sup>MR766</sup>) and a Brazilian strain, ZIKV<sup>BR</sup>. So, we infected PNT1A cells with ZIKV strains and performed an indirect immunofluorescence assay for protein envelope; monitored infectious viral particles production and RNA viral copies by plate assay and qPCR, respectively, and analyzed the miRNA cellular profile by PCR array. Our results demonstrated that human prostate cells are susceptible and permissive to ZIKV infection and did not present any imposition regarding infection by distinct strains of this virus. The strains did not differ in the kinetics of replication in prostate cells, but presented differences in miRNA's cell expression modulation. After infection, 16 miRNAs were modulated in prostate cells, a small group of 6 miRNAs were modulated by both strains while a set of 10 miRNAs showed to be modulated exclusively by ZIKV<sup>BR</sup>. *In silico* analyses predicted that the miRNA upregulated exclusively by the infection by the Brazilian strain may regulate genes and pathways associated to inflammation, immunity, cell survival and cell proliferation. Taken together, our results indicate that prostate may be an important role in the sexual transmission of ZIKV and highlights that different strains of ZIKV may induce a differential host miRNA expression which may influence the differences in the physiopathology presented after the infection by different strains.

**Keywords:** Prostate. Sexual transmission. miRNAs. Zika virus Brazilian strain. MR766 strain. Zika virus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Reconstrução estrutural do vírion do ZIKV por microscopia eletrônica criogênica. A porção esquerda da figura refere-se ao envelope viral, enquanto do lado direito estão representadas estruturas internas, como o nucleocapsídeo.....22
- Figura 2:** Representação esquemática do genoma do vírus Zika. As proteínas estruturais, C, prM/M e E são demonstradas em preto, enquanto as proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 estão representadas em azul. Flanqueando cada extremidade do genoma estão ilustradas as regiões não traduzíveis 5' e 3' (5'-UTR e 3'-UTR) .....23
- Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de vida do ZIKV .....25
- Figura 4:** Representação esquemática da via canônica de biogênese de miRNA.....29

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO CIENTÍFICO

**Figure 1: PNT1A cells are highly susceptible to ZIKV<sup>BR</sup> and ZIKV<sup>MR766</sup>.** Cells were infected with  $10^5$  PFU/mL of the respective strains for 1 hour. Seventy-two hours after infection cells were fixed with paraformaldehyde and indirect immunofluorescence for mAB 4G2 (red fluorescence) antibody was performed. DAPI was used for staining the nuclei (blue fluorescence). Mock was performed with the same procedure used for infected-cells. A) ZIKV<sup>MR766</sup> infected-cells; B) ZIKV<sup>BR</sup> infected-cells.....39

**Figure 2: ZIKV replicates efficiently in human prostate cells, producing a high amount of infectious viral particles 96 hours post infection.** PNT1A cells were infected with  $10^5$  PFU/mL of ZIKV<sup>MR766</sup> or ZIKV<sup>BR</sup>. Supernatants were collected and tittered by plaque assay after 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hpi. The graphic presents the mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments. The means are not statistically significant ( $p = 0.1039$ ).....40

**Figure 3: ZIKV replicates efficiently in human prostate cells, releasing a high amount of viral copies.** PNT1A cells were infected with  $10^5$  PFU/mL of ZIKV<sup>MR766</sup> or ZIKV<sup>BR</sup>. After 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hpi supernatants were collected and viral RNA copies were determined by qPCR. The graphic presents the mean  $\pm$  SD. Differences are not statistically significant ( $p = 0.2653$ ).....41

**Figure 4: Human prostate cells exhibit the peak of infection at 48 hpi for ZIKV<sup>MR766</sup> and at 72 hpi for ZIKV<sup>BR</sup>.** PNT1A cells were infected with  $10^5$  PFU/mL of ZIKV<sup>MR766</sup> or ZIKV<sup>BR</sup>. After 6, 12, 24, 48, 72 and 96 of infection cellular lysates were collected and viral RNA copies were determined by qPCR. High amounts of viral RNA copies were observed for both strains, with a peak of infection at 48 hpi for ZIKV<sup>MR766</sup> and 72 hpi for ZIKV<sup>BR</sup>. The graphic presents the mean  $\pm$  SD. The means are not statistically significant ( $p = 0.0949$ ).....42

**Figure 5: ZIKV<sup>MR766</sup> presented higher production of viral infectious particles than ZIKV<sup>BR</sup> in human prostate cells in most infections times.** PNT1A cells were infected with  $10^5$  PFU/mL of ZIKV<sup>MR766</sup>. After 6, 12, 24, 48, 72 and 96 of infection supernatants were collected and titled by plaque assay and viral RNA copies were determined by qPCR. ZIKV<sup>MR766</sup> showed greater production of infectious particles in relation to total particles released than ZIKV<sup>BR</sup>. The graphic presents the mean  $\pm$  SD. A) Total particles released in relation to infectious particles after infection by ZIKV<sup>MR766</sup>. The means are not statistically significant ( $p = 0.2119$ ). B) Total particles released

in relation to infectious particles after infection by ZIKV<sup>BR</sup>. The means are not statistically significant ( $p = 0.1864$ ) .....43

**Figure 6: Differential expression of cellular miRNAs in prostate cells after infection with different strains of ZIKV.** In red color are miRNAs upregulated and in blue color are miRNAs downregulated. \*miR-150-5p was downregulated in ZIKV<sup>MR766</sup> infection and upregulated in ZIKV<sup>BR</sup> infection.....46

**Figure 7:** *In silico* prediction of NF-kappa B signaling pathway enriched in ZIKV<sup>BR</sup> infection. The target genes of the miRNAs associated with this pathway are highlighted.....48

**Figure 8:** *In silico* prediction of TNF signaling pathway enriched in ZIKV<sup>BR</sup> infection. The target genes of the miRNAs associated with this pathway are highlighted.....49

**Figure 9:** *In silico* prediction of PI3K-AKT signaling pathway enriched in ZIKV<sup>BR</sup> infection. The target genes of the miRNAs associated with this pathway are highlighted.....50

**Figure 10:** *In silico* prediction of Apoptosis signaling pathway enriched in ZIKV<sup>BR</sup> infection. The target genes of the miRNAs associated with this pathway are highlighted.....51

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1:</b> List of deregulated miRNAs in prostate cells after ZIKV infection.....	45
<b>Table 2:</b> <i>In silico</i> prediction of pathways enriched in ZIKV <sup>BR</sup> infection. The target genes of the miRNAs associated with these pathways are highlighted. The genes illustrated in this table are target genes of more than three miRNAs differentially expressed in the PCR array.....	52
<b>Table S1:</b> Number of experimentally validated interactions among each miRNA and gene targets by TarBase v.07.....	70
<b>Table S2:</b> Pathways affected by predicted genes targets of miRNAs regulated after infection with ZIKV <sup>MR766</sup> and ZIKV <sup>BR</sup> .....	71
<b>Table S3:</b> Pathways affected by predicted targets of miRNAs regulated exclusively after infection with ZIKV <sup>BR</sup> .....	73
<b>Table S4:</b> Pathways affected by predicted targets of miR-150-5p.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μL</b>	Microlitro, do inglês <i>microliter</i>
<b>3' UTR</b>	Região não traduzível 3', do inglês <i>3' Untranslated Region</i>
<b>5' UTR</b>	Região não traduzível 5', do inglês <i>5' Untranslated Region</i>
<b>AGO2</b>	Componente catalítico argonauta 2 de RISC, do inglês <i>argonaute RISC catalytic component 2</i>
<b>AKT1</b>	Quinase serina/treonina AKT 1, do inglês <i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
<b>ATM</b>	Quinase serina/treonina ATM, do inglês <i>ATM serine/threonine kinase</i>
<b>BCL-2</b>	Regulador da apoptose BCL2, do inglês <i>BCL2 apoptosis regulator</i>
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
<b>C</b>	Proteína capsídeo, do inglês <i>Capsid protein</i>
<b>CCL2</b>	Ligante de quimiocina 2 motivo C-C, do inglês <i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
<b>CCND1</b>	Ciclina D1, do inglês <i>Cyclin D1</i>
<b>CCND2</b>	Ciclina D2, do inglês <i>Cyclin D2</i>
<b>CDK 4</b>	Quinase dependente de ciclina 4, do inglês <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
<b>CDK 6</b>	Quinase dependente de ciclina 6, do inglês <i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>CFLAR</b>	CASP8 e FADD como reguladores de apoptose, do inglês <i>CASP8 and FADD like apoptosis regulator</i>
<b>CHEK2</b>	Ponto de verificação quinase 2, do inglês <i>Checkpoint kinase 2</i>
<b>CSF</b>	Fluido cerebrospinal, do inglês <i>cerebrospinal fluid</i>
<b>CXCL8</b>	Ligante de quimiocina do motive C-X-C 8, do inglês <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6'-diamino-2-fenil-indol</i>
<b>DENV</b>	Vírus da dengue, do inglês <i>Dengue virus</i>
<b>DGCR8</b>	Subunidade complexa do microprocessador DGCR8, do inglês <i>DGCR8 microprocessor complex subunit</i>
<b>DICER</b>	Dicer, Ribonuclease III, do inglês <i>dicer, ribonuclease III</i>



<b>DMEM</b>	Meio Eagle modificado de dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DROSHA</b>	Ribonuclease III Droscha, do inglês <i>droscha ribonuclease III</i>
<b>E</b>	Proteína envelope, do inglês <i>envelope protein</i>
<b>EXP5</b>	Exportina 5, do inglês <i>Exportin 5</i>
<b>FAS</b>	Receptor de morte na superfície celular Fas, do inglês <i>Fas cell surface death receptor</i>
<b>FASLG</b>	Ligante Fas, do inglês <i>Fas ligand</i>
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i>
<b>G-CSF</b>	Fator estimulante de colônia granulócita, do inglês <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato, do inglês <i>Triphosphate guanosine</i>
<b>HBV</b>	Vírus da hepatite B, do inglês <i>Hepatitis B virus</i>
<b>HCC</b>	Carcinoma hepatocelular, do inglês <i>Hepatocellular carcinoma</i>
<b>HCV</b>	Vírus da hepatite C, <i>Hepatitis C Virus</i>
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>hpi</b>	Horas pós-infecção, do inglês <i>hours post infection</i>
<b>hsa</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>IDO</b>	Indoleamina 2,3-dioxigenase, do inglês <i>indoleamine 2,3-dioxigenase</i>
<b>IFA</b>	Ensaio de imunofluorescência, do inglês <i>immunofluorescence assay</i>
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G, do inglês <i>Immunoglobulin G</i>
<b>IL-1b</b>	Interleucina 1 beta, do inglês <i>Interleukin 1 beta</i>
<b>IL-6</b>	Interleucina 6, do inglês <i>Interleukin 6</i>
<b>INF <math>\gamma</math></b>	Interferon gama, do inglês <i>Interferon gamma</i>
<b>JEV</b>	Vírus da encefalite japonesa, do inglês <i>Japanese encephalitis virus</i>
<b>L-15</b>	Meio Leibovitz L-15, do inglês <i>Leibovitz L-15 medium</i>
<b>mAB</b>	Anticorpo monoclonal, do inglês <i>monoclonal antibody</i>
<b>MAPK1</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno 1, do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>

<b>MAPK8</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno 8, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase 8</i>
<b>MCL-1</b>	Regulador de apoptose MCL1, membro da família BCL2, do inglês <i>MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member</i>
<b>MDM</b>	Macrófago derivado de monócito, do inglês <i>monocyte-derived macrophage</i>
<b>MDM2</b>	Proto-oncogene MDM2, do inglês <i>MDM2 proto-oncogene</i>
<b>miRISC</b>	Complexo de silenciamento induzido pelo miRNA maduro, do inglês <i>microRNA-Induced Silencing Complex</i>
<b>miRNAs</b>	microRNAs
<b>mL</b>	Mililitro, do inglês <i>mililiter</i>
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro, do inglês <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
<b>NF-kappa B</b>	Fator nuclear kappa B, do inglês <i>Nuclear Fator kappa B</i>
<b>NS1</b>	Proteína não estrutural 1, do inglês <i>non-structural protein 1</i>
<b>NS2a</b>	Proteína não estrutural 2 a, do inglês <i>non-structural protein 2 a</i>
<b>NS2b</b>	Proteína não estrutural 2b, do inglês <i>non-structural protein 2 b</i>
<b>NS3</b>	Proteína não estrutural 3, do inglês <i>non-structural protein 3</i>
<b>NS4a</b>	Proteína não estrutural 4 a, do inglês <i>non-structural protein 4 a</i>
<b>NS4b</b>	Proteína não estrutural 4 b, do inglês <i>non-structural protein 4 b</i>
<b>NS5</b>	Proteína não estrutural 5, do inglês <i>non-structural protein 5</i>
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan Americana da Saúde
<b>P/S</b>	Penicilina/estreptomicina, do inglês <i>penicillin-streptomycin</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PFU/mL</b>	Unidades formadoras de placas por mililitro, do inglês <i>Plaque forming unit per mililiter</i>
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase, do inglês <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PI3KCD</b>	Quinase da subunidade catalítica delta da fosfatidilinositol 3-quinase, do inglês <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta</i>

<b>PKA</b>	Proteína quinase 4, do inglês <i>protein kinase A</i>
<b>pRb</b>	Proteína retinoblastoma, do inglês <i>Retinoblastoma protein</i>
<b>Pre-miRNA</b>	miRNA precursor, do inglês <i>miRNA precursor</i>
<b>Pri-miRNA</b>	miRNA primário, do inglês <i>primary miRNA</i>
<b>prM/M</b>	Proteína pré-membrana/Membrana, do inglês <i>pre membrane protein/Membrane</i>
<b>PTGS2</b>	Endoperóxido de prostaglandina sintetase 2, do inglês <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia da polymerase quantitativa em tempo real, do inglês <i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<b>Ran-GTP</b>	Proteína nuclear Ran de ligação a GTP, do inglês <i>Ran GTP-binding protein</i>
<b>RISC</b>	Complexo de silenciamento induzido por RNA, do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>RLC</b>	Complexo de carregamento de RISC, do inglês, <i>RISC-loading complex</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
<b>RT</b>	Temperatura ambiente, do inglês <i>Room temperature</i>
<b>SD</b>	Desvio padrão, do inglês <i>standart deviation</i>
<b>SGB / GBS</b>	Síndrome de Guillain-Barré do inglês <i>Guillain-Barre Syndrome</i>
<b>STAT3</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3, do inglês <i>Signal Transducer and Activator Of Transcription 3</i>
<b>TARBP</b>	Subunidade TARBP do complexo de carregamento RISC, do inglês <i>TARBP subunit of RISC loading complex</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TNFRSF1A</b>	Membro 1a da super família de receptores TNF, do inglês <i>TNF Receptor Superfamily member 1A</i>
<b>TNFSF10</b>	Membro 10 da super família TNF, do inglês <i>TNF superfamily member 10</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis factor alpha</i>
<b>TP53</b>	Proteína de tumor p53, do inglês <i>Tumor protein p53</i>

<b>TRAILR</b>	Receptor de ligante indutor de apoptose relacionado a TNF, do inglês <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor</i>
<b>WNV</b>	Vírus do oeste do Nilo, do inglês <i>West Nile virus</i>
<b>YFV</b>	Vírus da febre amarela, do inglês <i>Yellow fever virus</i>
<b>ZIKV</b>	Vírus da Zika, do inglês <i>Zika virus</i>
<b>ZIKV<sup>AF</sup></b>	Cepas africanas do vírus Zika
<b>ZIKV<sup>AS</sup></b>	Cepas asiáticas do vírus Zika
<b>ZIKV<sup>BR</sup></b>	Cepa Brasileira do vírus Zika, do inglês <i>Brazilian strain of Zika virus</i>
<b>ZIKV<sup>MR766</sup></b>	Cepa MR766 do vírus Zika, do inglês <i>MR766 strain of Zika virus</i>

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	32
<b>3.1 Introduction</b> .....	34
<b>3.2 Material and methods</b> .....	35
3.2.1 Cell Culture .....	35
3.2.2 Virus preparation .....	35
3.2.3 Plaque assay .....	36
3.2.4 Indirect Immunofluorescence assay .....	36
3.2.5 Viral Permissiveness Assay .....	37
3.2.6 Viral RNA copies quantification by qPCR .....	37
3.2.7 PCR analysis .....	38
3.2.8 Statistical analysis .....	38
<b>3.3 Results</b> .....	38
3.3.1 PNT1A cells are susceptible to ZIKV strains .....	38
3.3.2 Human prostate cells are permissive to ZIKV strains .....	39
3.3.3 ZIKV <sup>BR</sup> infection altered an exclusive set of cellular miRNAs .....	44
3.3.4 <i>In silico</i> prediction of target genes of miRNAs differentially expressed and pathways potentially enriched by the target genes .....	46
<b>3.4 Discussion</b> .....	52
<b>3.5 Conclusion</b> .....	61
<b>References</b> .....	61
<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL</b> .....	70
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

A emergência do vírus Zika (ZIKV) nos últimos anos resultou em um quadro de infecções sem precedente em países da América Latina e Caribe, culminando com a sua declaração como quadro de emergência em saúde pública global de fevereiro a novembro de 2016 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ORGANIZATION, 2016). Em resposta à declaração da OMS cientistas de diversos países começaram a investigar as propriedades do ZIKV e analisaram os casos recentes de microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Com base em diversos desses estudos a OMS concluiu que no surto recente o ZIKV é o agente etiológico da Síndrome congênita do ZIKV e provável desencadeador da SGB (ORGANIZATION, 2016).

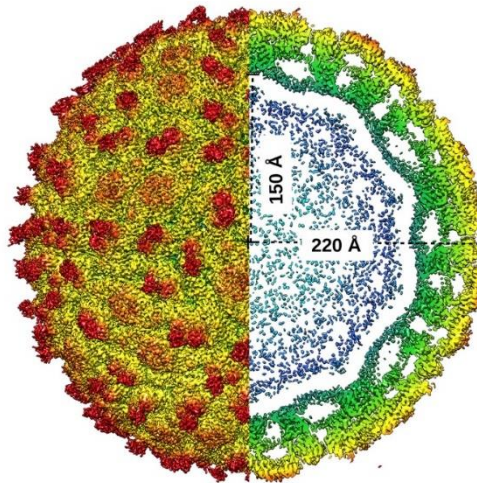
Apesar da relação entre o ZIKV e doenças neurológicas só ter sido proposta recentemente, o ZIKV foi descrito em 1947, sendo isolado a partir do sangue de um macaco-rhesus sentinela (*Macaca mulatta*), na floresta Zika, Uganda (DICK;KITCHEN; HADDOW, 1952). Os primeiros relatos de infecção humana por esse vírus ocorreram nesse mesmo país e na Tanzânia em 1952 (DICK;KITCHEN; HADDOW, 1952). Nos anos que se seguiram até 2006 os relatos de infecção humana por ZIKV foram esporádicos e restritos à países da África e sudeste asiático (PASSI *et al.*, 2017).

A primeira epidemia causada pelo ZIKV registrada fora das regiões africanas e asiáticas aconteceu na ilha de Yap, Micronésia, em 2007, onde estima-se que cerca de 73% da população foi infectada por esse vírus (DUFFY *et al.*, 2009). Posteriormente um segundo grande surto do ZIKV aconteceu entre 2013 e 2014 na Polinésia Francesa e foi acompanhado de um aumento expressivo de casos de SGB (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Atualmente, a infecção por ZIKV encontra-se emergente no hemisfério ocidental, possuindo casos relatados em vários países (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; LAZEAR; DIAMOND, 2016; PAN AMERICAN HEALTH, 2018). Um desses países é o Brasil, cuja infecção durante o período gestacional tem sido associada a Síndrome congênita do ZIKV em neonatos (FERNANDES *et al.*, 2016; YUN; LEE, 2017; FRANCA *et al.*, 2018).

O ZIKV é membro do gênero *Flavivirus* e junto com outros 2 gêneros constitui a família *Flaviviridae* (YE *et al.*, 2016). Assim como outros *Flavivirus*, o ZIKV é constituído por um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva (YE *et al.*, 2016). Apresenta-se como um vírion envelopado, icosaédrico de 40 a 50 nm de diâmetro (Figura 1) (SEVVANA *et al.*, 2018).

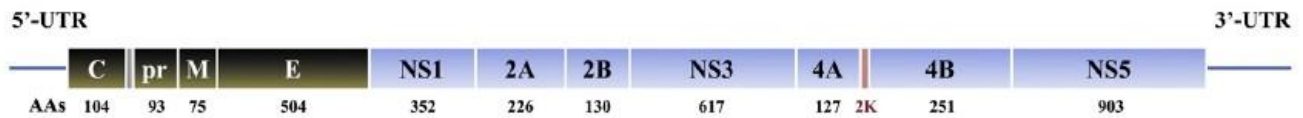
Seu genoma de aproximadamente 11.000 bases é traduzido na célula hospedeira em uma poliproteína viral, a qual é posteriormente processada dando origem a três proteínas estruturais: envelope (E), pré membrana/membrana (prM/M) e capsídeo (C); e, pelo menos, sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 (Figura 2) (WHITE *et al.*, 2016).

**Figura 1:** Reconstrução estrutural do vírion do ZIKV por microscopia eletrônica criogênica. A porção esquerda da figura refere-se ao envelope viral, enquanto do lado direito estão representadas estruturas internas, como o nucleocapsídeo.



Fonte: (SEVVANA *et al.*, 2018)

**Figura 2:** Representação esquemática do genoma do vírus Zika. As proteínas estruturais, C, prM/M e E são demonstradas em preto, enquanto as proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 estão representadas em azul. Flanqueando cada extremidade do genoma estão ilustradas as regiões não traduzíveis 5' e 3' (5'-UTR e 3'-UTR).



Fonte: modificado a partir de Ye *et al.*, 2016.

As proteínas estruturais E e M são essenciais para a infecção viral, participando do reconhecimento da célula hospedeira, ligação ao receptor de superfície celular e da endocitose mediada por receptores para a penetração viral (KAUFMANN; ROSSMANN, 2011; PERERA-LECOIN *et al.*, 2013). Já as proteínas NS atuam principalmente na replicação do ZIKV, e algumas funções ainda precisam ser decifradas. Apesar de ainda não ser totalmente conhecida a função da proteína NS1, as evidências disponíveis indicam que ela apresenta um papel inicial na replicação de *Flavivirus*, podendo atuar na formação do complexo de replicação (LINDENBACH; RICE, 1999; AKEY *et al.*, 2015). A proteína NS2a também participa no processo de replicação viral, e especula-se que possa estar associada com a encapsulação do genoma viral (KUMMERER; RICE, 2002; LEUNG *et al.*, 2008). Já as proteínas NS2b e NS4a são co-fatores para a atividade da NS3, modulando sua função de helicase (MURRAY; JONES; RICE, 2008).

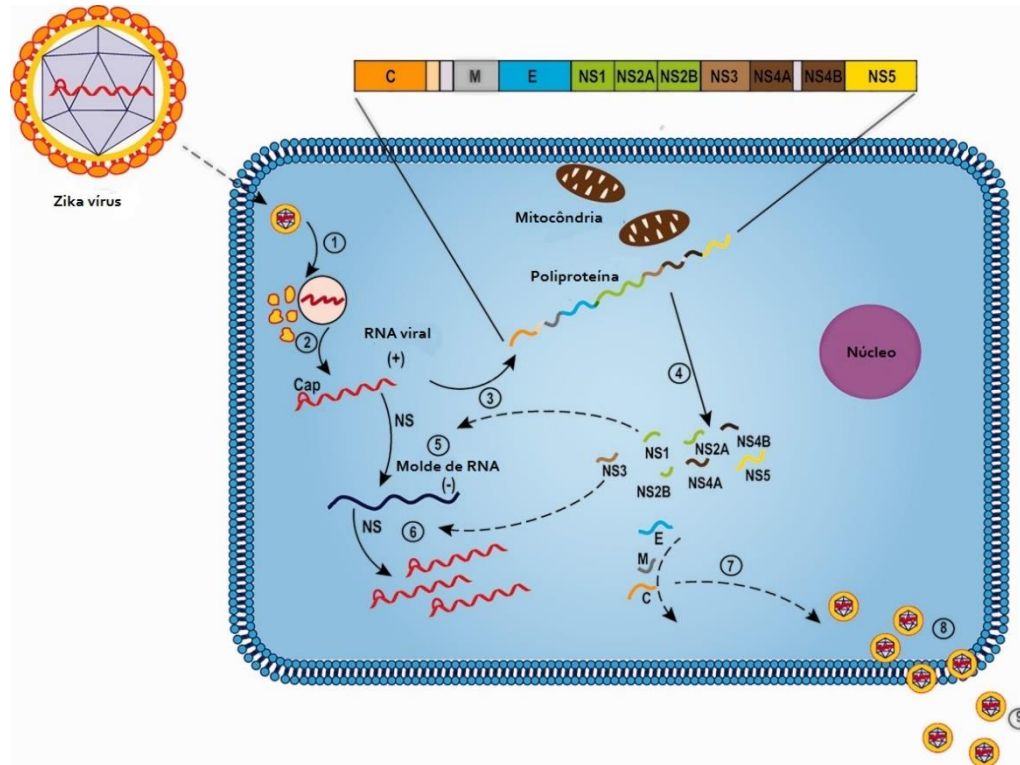
A proteína NS3 é uma enzima multifuncional, pois é uma RNA- helicase além de apresentar uma função proteolítica no processamento da proteína estrutural C (MURRAY; JONES; RICE, 2008). A proteína NS4b, assim como a NS4a, é uma proteína hidrofóbica, e acredita-se que seja um componente da replicase (complexo de replicação viral) (CHAMBERS *et al.*, 1990). Já a proteína NS5 apresenta papel central na replicação de *Flavivirus*, pois possui atividades de RNA polimerase dependente de RNA e de metiltransferase, essenciais para a síntese de RNA viral e adição de CAP no genoma viral (MURRAY; JONES; RICE, 2008).

O processo de infecção viral se inicia com a adsorção do ZIKV à uma célula suscetível pela interação de glicoproteínas da superfície viral com receptores da superfície celular, culminando



com a internalização do vírus em vesículas revestidas por clatrina, por meio de endocitose mediada por receptores. Posteriormente, uma mudança no pH interno endossomal resulta em mudanças conformacionais no vírion e liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira. O genoma de polaridade positiva do ZIKV é então traduzido em uma poliproteína precursora por meio de enzimas virais e celulares. Modificações co-traducionais e pós-traducionais originam as 3 proteínas virais estruturais e 7 proteínas não-estruturais. A replicação do genoma do ZIKV ocorre em vesículas, iniciando-se pela síntese de intermediários de replicação (RNA fita simples de polaridade negativa), que será utilizado como molde para a síntese de novos genomas de polaridade positiva, que deverá compor novos vírions. Após a síntese de todos os componentes virais, a montagem dos novos vírions ocorre na superfície do retículo endoplasmático, seguida por brotamento. Seguindo a rota secretora da célula hospedeira, os novos vírions dirigem-se à rede trans-Golgi, onde sofrem maturação e posteriormente são liberados da célula hospedeira por exocitose (Figura 3) (WHITE *et al.*, 2016).

**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de vida do ZIKV.



Fonte: modificado a partir de (White *et al.*, 2016)

A forma mais comum de transmissão do ZIKV ocorre por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (AGUMADU; RAMPHUL, 2018). Recentemente novas evidências sugerem novas vias de transmissão do ZIKV: perinatal (BESNARD *et al.*, 2014), contato sexual entre homem e mulher (RUSSELL *et al.*, 2017), entre homens (DECKARD *et al.*, 2016) e transfusão de sangue (MUSSO *et al.*, 2014; MARANO *et al.*, 2016). Estas vias de transmissão elevam o risco de epidemias em territórios que não apresentam a presença do vetor artrópode. A maioria das pessoas infectadas com ZIKV não apresentam sintoma algum, mas esses quando presentes assemelham-se aos de outras arboviroses filogeneticamente próximas, sendo os mais comuns febre, dores musculares, erupções cutâneas, dores de cabeça, vermelhidão nos olhos e dores articulares (DIAS *et al.*, 2018).

A partir de amostras isoladas das infecções na África e Ásia por ZIKV foram identificadas 3 linhagens geneticamente e geograficamente distintas desse vírus: do leste africano, do oeste africano e asiática (FAYE *et al.*, 2014). A recente emergência do ZIKV nas Américas resultou em novas análises filogenéticas, as quais revelaram que as cepas circulantes na América Latina

derivaram-se das cepas asiáticas e constituem dentro dessa linhagem, um novo clado americano (YE *et al.*, 2016).

A epidemia de infecções pelo ZIKV tem se espalhado rapidamente pelo hemisfério ocidental. A Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) registrou 223.477 casos autóctones de ZIKV, dos quais 61% ocorreram no Brasil no período entre 2015 e janeiro de 2018 (PAN AMERICAN HEALTH, 2018). Neste mesmo período também foram registrados 3.720 casos da síndrome congênita associada com a infecção pelo ZIKV, dos quais 79% acometeram fetos brasileiros, enquanto que os casos restantes aconteceram em países da América do Norte, América Latina, Caribe e Caribe não latino (PAN AMERICAN HEALTH, 2018).

Estudos com o ZIKV tem relatado um amplo tropismo tecidual e celular desse vírus (CHAN *et al.*, 2016; MINER; DIAMOND, 2017). O RNA viral tem sido isolado a partir de tecido cerebral fetal (MLAKAR *et al.*, 2016), placenta (BHATNAGAR *et al.*, 2017; REAGAN-STEINER *et al.*, 2017), tecido ocular, útero, vagina, testículo e fluídos corporais humanos (MINER; DIAMOND, 2017). A presença do vírus nesses tecidos tem estimulado estudos que ajudam a explicar a relação entre a infecção por ZIKV e microcefalia (GARCEZ *et al.*, 2016), onde foram sugeridos potenciais rotas de transmissão perinatal (TABATA *et al.*, 2016) e alertado para a persistência desse vírus nos sistemas reprodutores (BARZON *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2017).

Além da grande preocupação da relação do ZIKV com o sistema neural, a sua relação com o sistema reprodutor humano também tem sido alvo de diversos grupos de pesquisas que estão estudando o potencial do vírus em se replicar no sistema urogenital masculino. Essa problemática surgiu a partir do isolamento do RNA viral a partir de urina e sêmen de homens infectados pelo ZIKV (PAZ-BAILEY *et al.*, 2018). Adicionalmente, o RNA desse vírus também tem sido encontrado no sêmen de homens assintomáticos (MUSSO *et al.*, 2017) e sintomáticos (MANSUY *et al.*, 2016; TURMEL *et al.*, 2016; JOGUET *et al.*, 2017) para a febre do Zika. Essa persistência e presença indica que tecidos urogenitais humanos são potenciais reservatórios do ZIKV.

Até o momento os principais órgãos do sistema reprodutor masculino inferidos como potenciais reservatórios e repositores do ZIKV são os testículos e a próstata (STASSEN *et al.*, 2018). A infecção por ZIKV levou a danos testiculares resultando em risco de infertilidade em ratos (GOVERO *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016) e um estudo *in vitro* demonstrou que esse vírus infecta células de Sertoli, sendo esse um importante passo para estabelecer a infecção persistente nesse órgão (SIEMANN *et al.*, 2017). Além disso foi relatado que células prostáticas estromais

humanas são suscetíveis e permissivas ao ZIKV, produzindo partículas infecciosas de forma significativa (CHAN *et al.*, 2016; SPENCER *et al.*, 2018).

Estudos clínicos relataram a persistência do RNA do ZIKV por um pouco mais do que um mês na urina e até 370 dias no sêmen de pacientes infectados (BARZON *et al.*, 2016; BARZON *et al.*, 2018). Outro estudo com homens vasectomizados infectados com ZIKV revelaram a presença desse vírus em amostras de sêmen, apoiando a hipótese de que um órgão mais distal, como a próstata, é também um possível sítio de replicação para esse vírus no sistema reprodutor humano (ARSUAGA *et al.*, 2016; FROESCHL *et al.*, 2017).

Não obstante todas as questões que ainda precisam ser respondidas sobre o ZIKV e sua relação com o sistema reprodutor, alguns estudos tem observado que diferentes cepas do ZIKV podem apresentar diferentes padrões de infectividade e induzir respostas celulares diferentes. Demonstrou-se que cepas africanas do ZIKV (ZIKV<sup>AF</sup>) apresentam maior infectividade e replicação em células-tronco neurais do que uma cepa asiática (ZIKV<sup>AS</sup>). As cepas africanas induziram uma maior taxa de morte celular e resposta antiviral em comparação com a cepa ZIKV<sup>AS</sup> (SIMONIN *et al.*, 2016). Já um estudo em ratos observou que cepas ZIKV<sup>AF</sup> induzem danos mais graves à estrutura testicular do que cepas ZIKV<sup>AS</sup> (GOVERO *et al.*, 2016). Esses resultados sugerem que diferentes cepas podem conduzir a diferenças fisiopatológicas e moleculares durante a infecção por ZIKV.

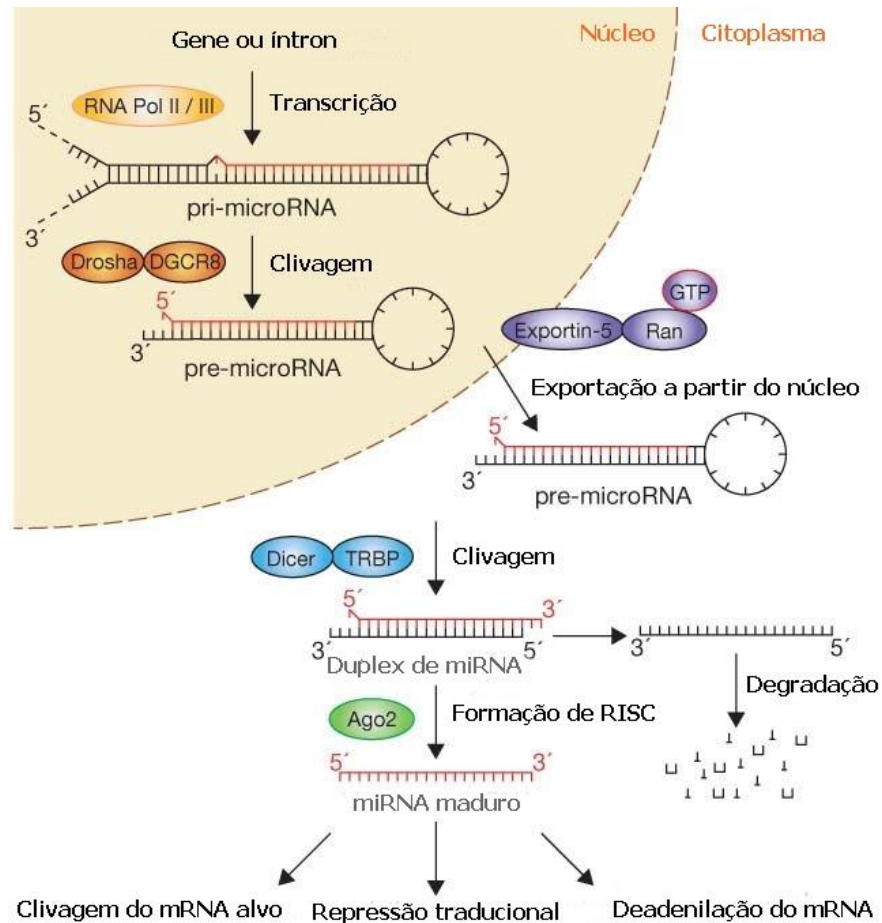
Entre as moléculas que podem ser analisadas para evidenciar diferença na resposta celular estão os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica e cujas funções estão associadas à vários processos celulares (BARTEL, 2004). Os miRNAs podem se originar por diversas vias, sendo a mais comum a via canônica, a qual envolve a transcrição do miRNA a partir do gene codificante, sua maturação e incorporação no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*) (KIM;HAN; SIOMI, 2009).

O *loci* genômicos de miRNAs são variáveis, de forma geral encontram-se isolados ou agrupados em regiões intergênicas ou em íntrons e éxons de genes codificantes (PEREIRA, 2015). A transcrição desses genes é feita pela RNA polimerase II, originando uma molécula com estrutura de “*stem-loop*” denominada miRNA primário (pri-miRNA). Posteriormente essa molécula é processada pela enzima Droscha juntamente com a proteína DGCR8 (*DGCR8 microprocessor complex subunit*), as quais clivam o pri-miRNA em um miRNA precursor (pre-miRNA), em forma

de “*hairpin*”. Essas etapas iniciais ocorrem no núcleo celular e a próxima etapa do processamento envolve a exportação do pre-miRNA para o citoplasma. Esse transporte é feito por um complexo constituído pela proteína Exportina 5 (Exp5) e pela proteína nuclear Ran de ligação a GTP (Ran-GTP) e ocorre através de poros nucleares (PEREIRA, 2015).

Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA é liberado do complexo após hidrolisação de GTP, e é posteriormente clivado pela enzima Dicer, originando um duplex de miRNA. A formação do complexo RISC ocorre em sequência, e envolve a ação de diversas proteínas. Em células humanas, Dicer que porta o duplex de miRNA é recrutada junto com a proteína Argonata 2 (AGO2) pela proteína TARBP (*TARBP subunit of RISC loading complex*), formando o complexo RLC - complexo de carregamento de RISC (do inglês, *RISC-loading complex*). RLC atua transferindo o duplex de miRNA de Dicer para AGO2, formando miRISC. Há ainda certa controvérsia em como ocorre a escolha da fita guia que constituirá RISC, mas acredita-se que a fita do duplex de miRNA que apresenta uma relativa instabilidade na porção 5' é selecionada como fita guia, enquanto a outra fita, a fita passageira, é degradada. Entretanto, ambos os membros do duplex podem se associar a RISC e serem funcionais. Assim RISC constitui-se por uma proteína AGO (1-4) e a fita guia de miRNA, figura 4 (PEREIRA, 2015).

**Figura 4:** Representação esquemática da via canônica de biogênese de miRNA.



Fonte: modificado a partir de (WINTER *et al.*, 2009).

Diante da ampla gama de moléculas precursoras até se alcançar o miRNA maduro, convencionou-se uma nomenclatura própria para a designação de cada estrutura. Os *loci* genômicos codificantes de miRNAs são abreviados pelo prefixo *MIR*, em itálico, enquanto que os pre-miRNAs recebem o mesmo prefixo, exceto pela grafia em itálico. Já as formas maduras são designadas pelo prefixo miR. Ainda, um prefixo de três letras precedendo o termo miR, refere-se a espécie, desse modo, “*hsa-miR*” refere-se a forma madura de miRNAs em *Homo sapiens*. Outra convenção foi adotada após se observar que ambas as fitas do duplex podem se ligar a RISC e exercer sua função. Desse modo, o sufixo “-5p” ou “-3p” indica a extremidade do pre-miRNA da qual se originou a forma madura. Assim, o miRNA *hsa-miR-142-3p* é originado a partir da extremidade 3’ da molécula precursora, enquanto o *hsa-miR-142-5p* origina-se da extremidade 5’ (PEREIRA, 2015).

Os miRNAs regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica. Sua regulação pós-transcricional ocorre principalmente por meio da ligação de sequências complementares dos miRNAs, denominadas *seed* à região 3'UTR do RNA mensageiro (mRNA) (BARTEL, 2004). A regulação dos miRNAs pode ocorrer por diversos mecanismos, como: inibição da tradução (PILLAI *et al.*, 2005; CHENDRIMADA *et al.*, 2007), desestabilização do transcrito-alvo (LLAVE *et al.*, 2002; BEHM-ANSMANT *et al.*, 2006), silenciamento transcricional (WU *et al.*, 2010; YOUNGER; COREY, 2011), promoção da transcrição (ZHANG;FAN;GENG; *et al.*, 2014; ZHANG;FAN;ZHANG; *et al.*, 2014) e intensificação da tradução (VASUDEVAN;TONG; STEITZ, 2007; OROM;NIELSEN; LUND, 2008). Por esses mecanismos os miRNAs exercem papéis regulatórios em diversos processos biológicos, como organogênese, proliferação e diferenciação celular, apoptose, neurogênese, resposta imunológica e tumorigênese (BARTEL, 2004), tornando-se assim, uma importante molécula para estudo.

Além das suas funções regulatórias os miRNAs também estão envolvidos na infecção viral e na modulação da resposta da célula hospedeira (BAVIA *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que durante a infecção com *Flavivirus* as células hospedeiras podem alterar sua expressão de miRNAs envolvidos em funções fisiológicas e estabelecer um quadro antiviral (BAVIA *et al.*, 2016). A alteração no perfil celular de miRNAs humanos em resposta à infecção viral pode ser resultado de duas diferentes tentativas: uma atuação da resposta imune inata da célula a fim de inibir a replicação do vírus ou uma estratégia viral a fim de induzir um ambiente intracelular mais favorável à sua replicação (UMBACH; CULLEN, 2009).

Estudos que visam correlacionar o perfil de miRNAs celulares com a infecção por *Flavivirus* tem sido amplamente relatados. A infecção com *West Nile virus* mostrou-se capaz de induzir a expressão do miR-532-5p em células renais, sendo um importante regulador da atividade antiviral, inibindo a replicação desse vírus (SLONCHAK *et al.*, 2015). De forma similar, o miR-30e apresentou atividade antiviral em células cervicais (HeLa) e pleurais (U937), inibindo a replicação do vírus da dengue, DENV (ZHU *et al.*, 2014). Em células hepáticas (Huh7) o DENV-2 alterou a expressão de 9 miRNAs em diferentes tempos pós infecção, alguns dos quais estão envolvidos com a resposta antiviral da célula (ESCALERA-CUETO *et al.*, 2015). De uma forma geral a infecção por *Flavivirus* induz a um aumento na expressão de grupos diversos de miRNAs, resposta associada a ativação de atividades antivirais das células hospedeiras.

A infecção por ZIKV alterou o perfil de expressão de miRNAs em astrócitos humanos. A infecção resultou na modulação de miRNAs que participam de processos relacionados ao ciclo de vida viral, ciclo celular, transcrição viral, resposta imune inata e processos virais (KOZAK *et al.*, 2017). Além disso a infecção por ZIKV em células de fígado, pulmão e rim alterou a expressão de genes codificadores de proteínas chaves na via dos miRNAs, como AGO2 que participa da formação do complexo de indução de silenciamento, além de DICER e DROSHA, que são proteínas chaves no processo de maturação dos miRNAs (FERREIRA *et al.*, 2018). Entretanto, desconhecem-se quais miRNAs possuem sua expressão alterada devido à infecção pelo ZIKV em células prostáticas e se a infecção por cepas de linhagens distintas desse vírus modula diferencialmente o perfil de miRNAs celulares.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos analisar *in vitro* a suscetibilidade, permissividade e o perfil de miRNAs celulares de células humanas epiteliais de próstata (células PNT1A) à infecção pelas cepas africana, ZIKV<sup>MR766</sup> e brasileira, ZIKV<sup>BR</sup> do vírus Zika e analisar, *in silico*, os genes alvos destes miRNAs e as vias nas quais eles estão envolvidos.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células prostáticas epiteliais humanas foram suscetíveis e altamente permissivas à infecção por ZIKV e não demonstraram suscetibilidade ou permissividade diferencial a cepa clássica africana do ZIKV, MR766 e a uma cepa brasileira, ZIKV<sup>BR</sup>. A análise do perfil de miRNAs celulares em células prostáticas humanas sugere que diferentes cepas do vírus Zika podem regular diferencialmente a expressão de miRNAs celulares, o que pode estar associado com os diferentes fenótipos de infecção relatados para cepas africanas e asiáticas do ZIKV. Além disso, 10 miRNAs celulares foram modulados exclusivamente após infecção pela cepa ZIKV<sup>BR</sup>, sugerindo que esse vírus pode modular diferentes alvos celulares em relação a cepas africanas. O nível de expressão do miR-150-5p foi diferencialmente modulado após infecção pelas cepas do ZIKV analisadas, o que sugere que esse miRNA pode apresentar uma importante função na infecção por cepas distintas do ZIKV.

Análises *in silico* sugerem que a cepa brasileira do Zika vírus pode afetar vias hospedeiras envolvidas na sobrevivência celular, resposta inflamatória, imunidade e proliferação celular. Por fim, nossos resultados indicam que a próstata é um potencial órgão para atuar como reservatório e repositório viral no sistema genital masculino durante a infecção pelo ZIKV, e que seu perfil de miRNAs celulares é diferencialmente modulado após infecção por cepas distintas desse vírus. Estudos adicionais são necessários para compreender o impacto de diferentes linhagens do Zika vírus na regulação de miRNAs celulares e expressão gênica no sistema reprodutor humano.

Nota: "As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP".

#### REFERÊNCIAS

AGUMADU, V. C.; RAMPHUL, K. Zika Virus: A Review of Literature. **Cureus**, v. 10, n. 7, p. e3025, Jul 22 2018. ISSN 2168-8184 (Print) 2168-8184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30254814> >.

AKEY, D. L.; BROWN, W. C.; JOSE, J.; KUHN, R. J.; SMITH, J. L. Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. **Bioessays**, v. 37, n. 5, p. 489-494, May 2015. ISSN 1521-1878 (Electronic)0265-9247 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25761098> >.

ARSUAGA, M.; BUJALANCE, S. G.; DIAZ-MENENDEZ, M.; VAZQUEZ, A.; ARRIBAS, J. R. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1107, Oct 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676342> >.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, Jan 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.

BARZON, L.; PACENTI, M.; FRANCHIN, E.; LAVEZZO, E.; TREVISAN, M.; SGARABOTTO, D.; PALU, G. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 32, Aug 11 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic) 1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27542178> >.

BARZON, L.; PERCIVALLE, E.; PACENTI, M.; ROVIDA, F.; ZAVATTONI, M.; DEL BRAVO, P.; CATTELAN, A. M.; PALU, G.; BALDANTI, F. Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. **Clin Infect Dis**, v. 66, n. 8, p. 1173-1180, Apr 3 2018. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300893> >.

BAVIA, L.; MOSIMANN, A. L.; AOKI, M. N.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. A glance at subgenomic flavivirus RNAs and microRNAs in flavivirus infections. **Virol J**, v. 13, p. 84, May 28 2016. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233361> >.

BEHM-ANSMANT, I.; REHWINKEL, J.; DOERKS, T.; STARK, A.; BORK, P.; IZAURRALDE, E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. **Genes Dev**, v. 20, n. 14, p. 1885-1898, Jul 15 2006. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815998> >.

BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 13, Apr 3 2014. ISSN 1560-7917 (Electronic) 1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538> >.

BHATNAGAR, J.; RABENECK, D. B.; MARTINES, R. B.; REAGAN-STEINER, S.; ERMIAIS, Y.; ESTETTER, L. B.; SUZUKI, T.; RITTER, J.; KEATING, M. K.; HALE, G.; GARY, J.; MUEHLENBACHS, A.; LAMBERT, A.; LANCIOTTI, R.; ODUYEBO, T.; MEANEY-DELMAN, D.; BOLANOS, F.; SAAD, E. A.; SHIEH, W. J.; ZAKI, S. R. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 3, p. 405-414, Mar 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959260> >.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTERE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A. L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.;

HALSTEAD, S. K.; WILLISON, H. J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J. C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H. P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHE, F. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, Apr 9 2016. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948433> >.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, p. 649-688, 1990. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2174669> >.

CHAN, J. F.; YIP, C. C.; TSANG, J. O.; TEE, K. M.; CAI, J. P.; CHIK, K. K.; ZHU, Z.; CHAN, C. C.; CHOI, G. K.; SRIDHAR, S.; ZHANG, A. J.; LU, G.; CHIU, K.; LO, A. C.; TSAO, S. W.; KOK, K. H.; JIN, D. Y.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerg Microbes Infect**, v. 5, p. e93, Aug 24 2016. ISSN 2222-1751 (Electronic) 2222-1751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27553173> >.

CHENDRIMADA, T. P.; FINN, K. J.; JI, X.; BAILLAT, D.; GREGORY, R. I.; LIEBHABER, S. A.; PASQUINELLI, A. E.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 823-828, Jun 14 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507929> >.

DECKARD, D. T.; CHUNG, W. M.; BROOKS, J. T.; SMITH, J. C.; WOLDAL, S.; HENNESSEY, M.; KWIT, N.; MEAD, P. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 14, p. 372-374, Apr 15 2016. ISSN 1545-861X (Electronic) 0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27078057> >.

DIAS, I. K. R.; SOBREIRA, C.; MARTINS, R. M. G.; SANTANA, K. F. S.; LOPES, M.; JOVENTINO, E. S.; VIANA, M. C. A. Zika virus: - a review of the main aspects of this type of arbovirosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 3, p. 261-269, May-Jun 2018. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29972554> >.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 509-520, Sep 1952. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440> >.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun 11 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034> >.

ESCALERA-CUETO, M.; MEDINA-MARTINEZ, I.; DEL ANGEL, R. M.; BERUMEN-CAMPOS, J.; GUTIERREZ-ESCOLANO, A. L.; YOCUPICIO-MONROY, M. Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. **Virus Res**, v. 196, p. 105-112, Jan 22 2015. ISSN 1872-7492 (Electronic) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445350> >.

FAYE, O.; FREIRE, C. C.; IAMARINO, A.; FAYE, O.; DE OLIVEIRA, J. V.; DIALLO, M.; ZANOTTO, P. M.; SALL, A. A. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421913> >.

FERNANDES, R. S.; CAMPOS, S. S.; FERREIRA-DE-BRITO, A.; MIRANDA, R. M.; BARBOSA DA SILVA, K. A.; CASTRO, M. G.; RAPHAEL, L. M.; BRASIL, P.; FAILLOUX, A. B.; BONALDO, M. C.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Culex quinquefasciatus from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 9, p. e0004993, Sep 2016. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27598421> >.

FERREIRA, R. N.; HOLANDA, G. M.; PINTO SILVA, E. V.; CASSEB, S. M. M.; MELO, K. F. L.; CARVALHO, C. A. M.; LIMA, J. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; CRUZ, A. C. R. Zika Virus Alters the Expression Profile of microRNA-Related Genes in Liver, Lung, and Kidney Cell Lineages. **Viral Immunol**, Jun 7 2018. ISSN 1557-8976 (Electronic) 0882-8245 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29878881> >.

FRANCA, T. L. B.; MEDEIROS, W. R.; SOUZA, N. L.; LONGO, E.; PEREIRA, S. A.; FRANCA, T. B. O.; SOUSA, K. G. Growth and Development of Children with Microcephaly Associated with Congenital Zika Virus Syndrome in Brazil. **Int J Environ Res Public Health**, v. 15, n. 9, Sep 13 2018. ISSN 1660-4601 (Electronic) 1660-4601 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30216976> >.

FROESCHL, G.; HUBER, K.; VON SONNENBURG, F.; NOTHDURFT, H. D.; BRETZEL, G.; HOELSCHER, M.; ZOELLER, L.; TROTTMANN, M.; PAN-MONTOJO, F.; DOBLER, G.; WOELFEL, S. Long-term kinetics of Zika virus RNA and antibodies in body fluids of a vasectomized traveller returning from Martinique: a case report. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 55, Jan 10 2017. ISSN 1471-2334 (Electronic) 1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28068904> >.

GARCEZ, P. P.; LOIOLA, E. C.; MADEIRO DA COSTA, R.; HIGA, L. M.; TRINDADE, P.; DELVECCHIO, R.; NASCIMENTO, J. M.; BRINDEIRO, R.; TANURI, A.; REHEN, S. K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, v. 352, n. 6287, p. 816-818, May 13 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27064148> >.

GOVERO, J.; ESAKKY, P.; SCHEAFFER, S. M.; FERNANDEZ, E.; DRURY, A.; PLATT, D. J.; GORMAN, M. J.; RICHTER, J. M.; CAINE, E. A.; SALAZAR, V.; MOLEY, K. H.; DIAMOND, M. S. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438-442, Dec 15 2016. ISSN

1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798603> >.

JOGUET, G.; MANSUY, J. M.; MATUSALI, G.; HAMDI, S.; WALSCHAERTS, M.; PAVILI, L.; GUYOMARD, S.; PRISANT, N.; LAMARRE, P.; DEJUCQ-RAINSFORD, N.; PASQUIER, C.; BUJAN, L. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 11, p. 1200-1208, Nov 2017. ISSN 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28838639> >.

KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes Infect**, v. 13, n. 1, p. 1-9, Jan 2011. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869460> >.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 126-139, Feb 2009. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165215> >.

KOZAK, R. A.; MAJER, A.; BIONDI, M. J.; MEDINA, S. J.; GONEAU, L. W.; SAJESH, B. V.; SLOTA, J. A.; ZUBACH, V.; SEVERINI, A.; SAFRONETZ, D.; HIEBERT, S. L.; BENIAC, D. R.; BOOTH, T. F.; BOOTH, S. A.; KOBINGER, G. P. MicroRNA and mRNA Dysregulation in Astrocytes Infected with Zika Virus. **Viruses**, v. 9, n. 10, Oct 14 2017. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29036922> >.

KUMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J Virol**, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, May 2002. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967294> >.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **J Virol**, v. 90, n. 10, p. 4864-4875, May 15 2016. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962217> >.

LEUNG, J. Y.; PIJLMAN, G. P.; KONDRATIEVA, N.; HYDE, J.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **J Virol**, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, May 2008. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337583> >.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J Virol**, v. 73, n. 6, p. 4611-4621, Jun 1999. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233920> >.

LLAVE, C.; XIE, Z.; KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2053-2056, Sep 20 2002.

ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242443> >.

MA, W.; LI, S.; MA, S.; JIA, L.; ZHANG, F.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WONG, G.; ZHANG, S.; LU, X.; LIU, M.; YAN, J.; LI, W.; QIN, C.; HAN, D.; QIN, C.; WANG, N.; LI, X.; GAO, G. F. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1511-1524 e1510, Dec 1 2016. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884405> >.

MANSUY, J. M.; PASQUIER, C.; DAUDIN, M.; CHAPUY-REGAUD, S.; MOINARD, N.; CHEVREAU, C.; IZOPET, J.; MENGELLE, C.; BUJAN, L. Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 8, p. 894-895, Aug 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477981> >.

MARANO, G.; PUPELLA, S.; VAGLIO, S.; LIUMBRUNO, G. M.; GRAZZINI, G. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. **Blood Transfus**, v. 14, n. 2, p. 95-100, Mar 2016. ISSN 1723-2007 (Print) 1723-2007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674815> >.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134-142, Feb 8 2017. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182948> >.

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. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, n. 10, p. 951-958, Mar 10 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862926> >.

MOREIRA, J.; PEIXOTO, T. M.; SIQUEIRA, A. M.; LAMAS, C. C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 5, p. 296-305, May 2017. ISSN 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28062314> >.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 699-708, Sep 2008. ISSN 1740-1526 (Print) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18587411> >.

MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C.; BIERLAIRE, D.; ZISOUS, K.; SHAN YAN, A.; CAO-LORMEAU, V. M.; BROULT, J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 14, Apr 10 2014. ISSN 1560-7917 (Electronic) 1025-496X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739982> >.



MUSSO, D.; RICHARD, V.; TEISSIER, A.; STONE, M.; LANTERI, M. C.; LATONI, G.; ALSINA, J.; REIK, R.; BUSCH, M. P.; RECIPIENT, E.; DONOR EVALUATION STUDY, Z. S. G. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 12, p. 1001 e1001-1001 e1003, Dec 2017. ISSN 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28711704> >.

ORGANIZATION, W. H. Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus. November 10 2016 2016. Disponível em: < [http://www.who.int/en/news-room/detail/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-\(2005\)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus](http://www.who.int/en/news-room/detail/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-(2005)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus) >. Acesso em: Setembro 26 2018.

OROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Mol Cell**, v. 30, n. 4, p. 460-471, May 23 2008. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498749> >.

PAN AMERICAN HEALTH, O. W. H. O. **Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2018 Cumulative Cases: PAHO/WHO PHE/HIM/DVA 2018.**

PASSI, D.; SHARMA, S.; DUTTA, S. R.; AHMED, M. Zika Virus Diseases - The New Face of an Ancient Enemy as Global Public Health Emergency (2016): Brief Review and Recent Updates. **Int J Prev Med**, v. 8, p. 6, 2017. ISSN 2008-7802 (Print) 2008-7802 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28250906> >.

PAZ-BAILEY, G.; ROSENBERG, E. S.; DOYLE, K.; MUNOZ-JORDAN, J.; SANTIAGO, G. A.; KLEIN, L.; PEREZ-PADILLA, J.; MEDINA, F. A.; WATERMAN, S. H.; GUBERN, C. G.; ALVARADO, L. I.; SHARP, T. M. Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Preliminary Report. **N Engl J Med**, v. 379, n. 13, p. 1234-1243, Sep 27 2018. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195756> >.

PEREIRA, T. C. O. **Introdução ao mundo dos miRNAs.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética: 2015. 342 ISBN 978-85-89265-21-8.

PERERA-LECOIN, M.; MEERTENS, L.; CARNEC, X.; AMARA, A. Flavivirus entry receptors: an update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69-88, Dec 30 2013. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381034> >.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; ARTUS, C. G.; ZOLLER, T.; COUGOT, N.; BASYUK, E.; BERTRAND, E.; FILIPOWICZ, W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1573-1576, Sep 2 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081698> >.

REAGAN-STEINER, S.; SIMEONE, R.; SIMON, E.; BHATNAGAR, J.; ODUYEBO, T.; FREE, R.; DENISON, A. M.; RABENECK, D. B.; ELLINGTON, S.; PETERSEN, E.; GARY, J.; HALE, G.; KEATING, M. K.; MARTINES, R. B.; MUEHLENBACHS, A.; RITTER, J.; LEE, E.; DAVIDSON, A.; CONNERS, E.; SCOTLAND, S.; SANDHU, K.; BINGHAM, A.; KASSENS, E.; SMITH, L.; ST GEORGE, K.; AHMAD, N.; TANNER, M.; BEAVERS, S.; MIERS, B.; VANMALDEGHEM, K.; KHAN, S.; RABE, I.; GOULD, C.; MEANEY-DELMAN, D.; HONEIN, M. A.; SHIEH, W. J.; JAMIESON, D. J.; FISCHER, M.; ZAKI, S. R.; COLLABORATION, U. S. Z. P. R.; ZIKA VIRUS RESPONSE, E.; SURVEILLANCE TASK FORCE PATHOLOGY, T. Evaluation of Placental and Fetal Tissue Specimens for Zika Virus Infection - 50 States and District of Columbia, January-December, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 66, n. 24, p. 636-643, Jun 23 2017. ISSN 1545-861X (Electronic) 0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640798> >.

RUSSELL, K.; HILLS, S. L.; OSTER, A. M.; PORSE, C. C.; DANYLUK, G.; CONE, M.; BROOKS, R.; SCOTLAND, S.; SCHIFFMAN, E.; FREDETTE, C.; WHITE, J. L.; ELLINGSON, K.; HUBBARD, A.; COHN, A.; FISCHER, M.; MEAD, P.; POWERS, A. M.; BROOKS, J. T. Male-to-Female Sexual Transmission of Zika Virus-United States, January-April 2016. **Clin Infect Dis**, v. 64, n. 2, p. 211-213, Jan 15 2017. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27986688> >.

SEVVANA, M.; LONG, F.; MILLER, A. S.; KLOSE, T.; BUDA, G.; SUN, L.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. Refinement and Analysis of the Mature Zika Virus Cryo-EM Structure at 3.1 Å Resolution. **Structure**, v. 26, n. 9, p. 1169-1177 e1163, Sep 4 2018. ISSN 1878-4186 (Electronic) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29958768> >.

SIEMANN, D. N.; STRANGE, D. P.; MAHARAJ, P. N.; SHI, P. Y.; VERMA, S. Zika Virus Infects Human Sertoli Cells and Modulates the Integrity of the In Vitro Blood-Testis Barrier Model. **J Virol**, v. 91, n. 22, Nov 15 2017. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878076> >.

SIMONIN, Y.; LOUSTALOT, F.; DESMETZ, C.; FOULONGNE, V.; CONSTANT, O.; FOURNIER-WIRTH, C.; LEON, F.; MOLES, J. P.; GOUBAUD, A.; LEMAITRE, J. M.; MAQUART, M.; LEPARC-GOFFART, I.; BRIANT, L.; NAGOT, N.; VAN DE PERRE, P.; SALINAS, S. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, v. 12, p. 161-169, Oct 2016. ISSN 2352-3964 (Electronic) 2352-3964 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688094> >.

SLONCHAK, A.; SHANNON, R. P.; PALI, G.; KHROMYKH, A. A. Human MicroRNA miR-532-5p Exhibits Antiviral Activity against West Nile Virus via Suppression of Host Genes SESTD1 and TAB3 Required for Virus Replication. **J Virol**, v. 90, n. 5, p. 2388-2402, Dec 16 2015. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26676784> >.

SPENCER, J. L.; LAHON, A.; TRAN, L. L.; ARYA, R. P.; KNEUBEHL, A. R.; VOGT, M. B.; XAVIER, D.; ROWLEY, D. R.; KIMATA, J. T.; RICO-HESSE, R. R. Replication of Zika Virus in Human Prostate Cells: A Potential Source of Sexually Transmitted Virus. **J Infect Dis**, v. 217, n. 4, p. 538-547, Jan 30 2018.



ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968863> >.

STASSEN, L.; ARMITAGE, C. W.; VAN DER HEIDE, D. J.; BEAGLEY, K. W.; FRENTIU, F. D. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. **Viruses**, v. 10, n. 4, Apr 16 2018. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659541> >.

TABATA, T.; PETITT, M.; PUERTA-GUARDO, H.; MICHLMAYR, D.; WANG, C.; FANG-HOOVER, J.; HARRIS, E.; PEREIRA, L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 2, p. 155-166, Aug 10 2016. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27443522> >.

TURMEL, J. M.; ABGUEGUEN, P.; HUBERT, B.; VANDAMME, Y. M.; MAQUART, M.; LE GUILLOU-GUILLEMETTE, H.; LEPARC-GOFFART, I. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2501, Jun 18 2016. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27287833> >.

UMBACH, J. L.; CULLEN, B. R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. **Genes Dev**, v. 23, n. 10, p. 1151-1164, May 15 2009. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451215> >.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1931-1934, Dec 21 2007. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048652> >.

WHITE, M. K.; WOLLEBO, H. S.; DAVID BECKHAM, J.; TYLER, K. L.; KHALILI, K. Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Ann Neurol**, v. 80, n. 4, p. 479-489, Oct 2016. ISSN 1531-8249 (Electronic) 0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27464346> >.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 228-234, Mar 2009. ISSN 1476-4679 (Electronic) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255566> >.

WU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; NI, F.; LIU, C.; QI, Y. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. **Mol Cell**, v. 38, n. 3, p. 465-475, May 14 2010. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381393> >.

YE, Q.; LIU, Z. Y.; HAN, J. F.; JIANG, T.; LI, X. F.; QIN, C. F. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infect Genet Evol**, v. 43, p. 43-49, Sep 2016. ISSN 1567-

7257 (Electronic) 1567-1348 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156653> >.

YOUNGER, S. T.; COREY, D. R. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 13, p. 5682-5691, Jul 2011. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21427083> >.

YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **J Microbiol**, v. 55, n. 3, p. 204-219, Mar 2017. ISSN 1976-3794 (Electronic) 1225-8873 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243937> >.

ZHANG, Y.; FAN, M.; GENG, G.; LIU, B.; HUANG, Z.; LUO, H.; ZHOU, J.; GUO, X.; CAI, W.; ZHANG, H. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. **Retrovirology**, v. 11, p. 23, Mar 12 2014. ISSN 1742-4690 (Electronic) 1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620741> >.

ZHANG, Y.; FAN, M.; ZHANG, X.; HUANG, F.; WU, K.; ZHANG, J.; LIU, J.; HUANG, Z.; LUO, H.; TAO, L.; ZHANG, H. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. **RNA**, v. 20, n. 12, p. 1878-1889, Dec 2014. ISSN 1469-9001 (Electronic) 1355-8382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25336585> >.

ZHU, X.; HE, Z.; HU, Y.; WEN, W.; LIN, C.; YU, J.; PAN, J.; LI, R.; DENG, H.; LIAO, S.; YUAN, J.; WU, J.; LI, J.; LI, M. MicroRNA-30e\* suppresses dengue virus replication by promoting NF-kappaB-dependent IFN production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3088, Aug 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122182> >.

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 18/03/2019

---

Assinatura do autor