

Avaliação do perfil de expressão de genes relacionados a via de microrna's e apoptose em células neurais infectadas experimentalmente pelo vírus Zika (ZIKV)

Evaluation of the expression of genes related to the microrna's via and apoptose in neural cells experimentally infected by Zika Virus (ZIKV)

DOI:10.34119/bjhrv3n3-242

Recebimento dos originais:10/05/2020

Aceitação para publicação:29/06/2020

Priscylla Celeste Milhomem Silva Fecury

Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia

Instituição: Universidade Estadual do Pará

Endereço: Travessa Angustura, 2219 - Pedreira, Belém - PA

E-mail: pfecury@gmail.com

Jardel Fabio Lopes Ferreira

Mestre em Virologia

Instituição: Instituto Evandro Chagas

Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil

E-mail: jardell.fe@gmail.com

Gustavo Moraes Holanda

Doutor em Virologia

Instituição: Instituto Evandro Chagas e Universidade da Amazônia

Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil

E-mail: holandagm@gmail.com

Carlos Alberto Marques de Carvalho

Doutor em Química Biológica

Instituição: Instituto Evandro Chagas

Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil

E-mail: c_marques@live.com

Karla Fabiane Lopes de Melo

Mestre em Virologia

Instituição: Instituto Evandro Chagas e Universidade Federal do Pará

Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil

E-mail: karlamello.bio@gmail.com

Walter Felix Franco Neto

Mestre em Virologia

Instituição: Instituto Evandro Chagas

Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil

E-mail: walter96neto@gmail.com

Francisco Canindé Ferreira de Luna

Mestre em Neurociências e Biologia Celular
Instituição: Universidade Federal do Pará
Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Guamá, Belém - PA
E-mail: lunafcf@gmail.com

Murilo Tavares Amorim

Graduando em Biomedicina
Instituição: Instituto Evandro Chagas
Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil
E-mail: murilotavares35@gmail.com

Eliana Vieira Pinto da Silva

Doutora em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários
Instituição: Instituto Evandro Chagas
Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil
E-mail: elianapinto@iec.pa.gov.br

Juarez Antônio Simões Quaresma

Doutor em Patologia
Instituição: Instituto Evandro Chagas e Universidade Estadual do Pará
Endereço: Travessa Angustura, 2219 - Pedreira, Belém - PA
E-mail: juarez.quaresma@gmail.com

Samir Mansour Moraes Casseb

Doutor em Virologia
Instituição: Instituto Evandro Chagas
Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil
E-mail: samir.casseb@gmail.com

Ana Cecília Ribeiro Cruz

Doutora em Biologia Parasitária
Instituição: Instituto Evandro Chagas e Universidade Estadual do Pará
Endereço: Rodovia Br-316 Km 7 S/N – Levilândia, Ananindeua, PA, Brasil
E-mail: anacecilia@iec.pa.gov.br

RESUMO

O vírus zika é um arbovírus transmitido por mosquitos *Aedes*, com ocorrência descrita juntamente com o aumento da microcefalia em recém nascidos. Tendo em vista a gravidade associada aos casos de microcefalia e outras desordens neurológicas, a Organização Mundial da Saúde chegou a caracterizá-lo como sendo de Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de expressão de genes que codificam proteínas-chave relacionadas ao microRNA e vias de apoptose em células neurais de roedores da família *Muridae* infectadas por esse vírus. As células neurais infectadas foram Neuro-2a, e os métodos empregados foram reação quantitativa em cadeia da transcrição reversa-polimerase e bioluminescência. A produção viral e a ativação da caspase-3/7 foram maiores às 96 horas após a infecção, bem como a expressão de genes que codificam Ago1, DGCR8, RIG-I e FAS-L.

Palavras-Chave: Zika Vírus, MicroRNA, Apoptose e Flavivirus

ABSTRACT

Virus zika is an arbovirus transmitted by *Aedes* mosquitoes, occurring described together with the increase in microcephaly in newborns. In view of the severity associated with cases of microcephaly and other neurological disorders, the World Health Organization came to characterize it as a Public Health Emergency of National Importance. The objective of this work was to determine the expression profile of genes that encode key proteins related to microRNA and apoptosis pathways in neural cells of rodents of the Muridae family infected by this virus. The infected neural cells were Neuro-2a, and the methods employed were quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and bioluminescence. Viral production and caspase-3/7 activation were higher at 96 hours after infection, as well as the expression of genes encoding Ago1, DGCR8, RIG-I and FAS-L.

Keywords: Zika vírus, microRNAs, apoptosis and *Flavivirus*.

1 INTRODUÇÃO

O vírus zika (ZIKV) é um arbovírus, com um genoma de RNA de sentido positivo de fita única responsável por codificar três proteínas estruturais (C, prM / M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH; RICE, 1997). O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e é transmitido aos seres humanos principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*; seu primeiro isolamento foi descrito na floresta do zika, Uganda, em 1947 (DICK, 1952).

A infecção pelo ZIKV pode ser assintomática em até 80% dos casos; sinais e sintomas incluem febre, letargia, dor ocular, conjuntivite, erupção cutânea, mialgia e artralgia (SHAN et al. 2016). A infecção pelo ZIKV também pode levar à microcefalia, que consiste em uma malformação congênita na qual a circunferência da cabeça do recém-nascido é menor que a média esperada para a idade (OMS 2018).

As células progenitoras neurais humanas (hNPCs), que estão presentes durante o desenvolvimento do cérebro embrionário e se diferenciam em vários tipos de neurônios são alvos prováveis do ZIKV. A neuropatia associada ao ZIKV pode ser explicada devido à desregulação do ciclo celular e morte, levando a uma diminuição no crescimento populacional de hNPCs (TANG et al. 2016).

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA de fita simples com aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos que não codificam proteínas, atuando como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (CROCE, 2009). O primeiro estágio da biogênese do miRNA é a transcrição de seu gene pela RNA

polimerase II /III, originando um miRNA primário (pri- miRNA), que possui uma cauda poli (A) na extremidade 3 e uma 5'-cap. A RNase III, Droscha e seu cofator DGCR8 (região crítica da síndrome de Di George, ponto 8), que reconhece o grampo e tem uma função de “régua” para Droscha, clivam o pri- miRNA, que é chamado pré-miRNA (MELO; MELO, 2014). O pré-miRNA é exportado através da proteína exportina-5 para o citoplasma, onde ele é processado por Dicer, gerando um miRNA de cadeia dupla. A molécula de miRNA é finalmente incorporada a um complexo chamado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que possui as proteínas Argonaute como os principais componentes. Apenas um dos filamentos de miRNA permanece no complexo RISC, como regulador da expressão gênica (RICARTE; KIMURA, 2016).

A regulação da expressão gênica ocorre com base na complementaridade entre as bases do miRNA e do mRNA. A degradação dos mRNAs é feita quando há conformidade perfeita entre as bases, enquanto a paridade incompleta resulta em inibição da tradução (RICARTE; KIMURA, 2016).

Durante a infecção pelo ZIKV, a primeira barreira rompida é a pele, através da picada do mosquito fêmea, que inocula o vírus na corrente sanguínea. O vírus infecta células dendríticas e depois migra para os linfonodos, onde há apresentação de seus antígenos aos linfócitos T, principalmente CD4⁺, onde o vírus se replica e depois a infecção se espalha. Nesse ponto, existem substâncias na saliva dos mosquitos que regulam negativamente a produção de interferon- γ (IFN- γ) e regulam positivamente a produção de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) (ZEIDNER et al. 1999; WU et al. 2000; HO et al. 2001).

Os micrócitos e os astrócitos murinos RIG-I são essenciais para as respostas inflamatórias da glia. Além disso, sua presença como um componente importante nas respostas inflamatórias e antivirais da glia ao vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e herpesvírus murídeo 68 (MHV-68) sugere um papel fundamental do IGF- I na neuroinflamação associada ao DNA e Vírus de RNA (CRILL et al. 2015).

O FAS-L inicia o processo de apoptose ligando-se ao seu receptor de superfície do FAS, levando à ativação de caspases e à liberação do citocromo C pelas mitocôndrias, resultando em apoptose (KAVURMA; KHACHIGIAN, 2003). A morte celular mediada por Fas- L/Fas desempenha um papel importante na resposta imune, por exemplo, na limitação da proliferação excessiva de linfócitos ativados na periferia após a eliminação de

antígenos, ou também na eliminação e inativação de timócitos autorreativos (DHEIN et al. 1995).

2 OBJETIVO

Determinar o perfil de expressão de genes que codificam proteínas-chave para a biogênese de miRNAs, FAS-L e RIG-I, e a ativação de apoptose em células neurais de murinos infectadas pelo ZIKV.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi um estudo experimental não randomizado, no qual não houve participação de animais, humanos ou meio ambiente. Apenas uma amostra viral previamente coletada e isolada em culturas de células foi usada. A amostra viral pertence à Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB), Instituto Evandro Chagas (IEC), e corresponde à cepa isolada do primeiro caso de morte de adulto no estado do Maranhão, Brasil (BeH818308).

As células de neuroblastoma murino Neuro-2A (N2A) foram mantidas em meio Neurobasal-A (Gibco, EUA), suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), estreptomicina (100 U / mL) e penicilina (100 U / mL). As células foram mantidas numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ a 37 ° C (Bhat et al. 2016).

A inoculação viral foi realizada em placas de cultura quando as monocamadas celulares exibiram mais de 70% de confluência no substrato. O inóculo foi utilizado a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5, em seguida, incubadas durante 1 h a 37 ° C com 5% de CO₂ para a adsorção viral. Após o tempo de adsorção viral, o inóculo foi removido e um meio de manutenção suplementado com 2% de SFB foi adicionado. A placa foi incubada a 37 ° C com 5% de CO₂ durante até 96 h. A cada 24 horas pós-infecção (hpi), uma amostra era coletada para extração de mRNA, titulação viral e teste de apoptose.

A análise de ativação da apoptose foi realizada com um ensaio de imunoluminescência química, em uma reação triplicada da amostra de células coletadas a cada 24 hpi. A reação foi realizada com o kit Caspase-GloAssay 3/7 (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O ensaio foi realizado no sistema de detecção múltipla GloMax (Promega, EUA).

Os mRNAs e o RNA viral foram extraídos com o Maxwell 16 Cell LEV RNA Purification Kit (Promega, EUA) do material em suspensão das culturas infectadas a cada 24 hpi a 96 hpi, de acordo com as especificações do fabricante. A determinação da

concentração e pureza do material foi realizada no Qubit 2.0 (Invitrogen, EUA), utilizando o kit comercial Qubit RNA BR Assay (Invitrogen, EUA), conforme descrito pelo fabricante.

A quantificação e titulação do RNA viral foram realizadas como descrito por Lanciotti et al. (2008). As técnicas foram realizadas no Rotor Gene (Qiagen, ALE), utilizando um Master Mix PCR Taqman One Step PCR (Life Technologies, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A replicação viral foi medida pelo ensaio da unidade formadora de placas (PFU).

Para quantificar os mRNAs, o equipamento Rotor Gene (Qiagen, ALE) foi usada com kit GoTaq Master Mix ® qPCR (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos foram utilizados para cada alvo, além dos controles endógenos de GAPDH e β -actina (Tabela 1).

Tabela 1: Representação dos oligonucleotídeos usados para a análise da expressão de genes relacionados à via do miRNA

Nome	Sequência
DGCR8-F	5'GCAAGATGCACCCACAAAGA 3'
DGCR8-R	5' TTGAGGACACGCTGCATGTAC 3'
Ago 1-F	5' GACCTCCGCACGGGTATATG 3'
Ago 1-R	5' GGTTTCCCCACAGTGCCAAT 3'
Ago 2-F	5' TGGTTTGGCTTCCATCAGTCC 3'
Ago 2-R	5' CCTTGTAACGCTGTTGCTGAC 3'
Ago 3-F	5' ACCTGTGGGGCGTTCATTT 3'
Ago 3-R	5' GCCGAACAGACTGATGGAAT 3'
Ago 4-F	5' AAATATGCGGCCGCATGGAAATCGGCTCCGCAGG 3'
Ago 4-R	5'AAGCGCAATTGGCGATCGCTCAGGCAAATACATAGTGTGCTGG 3'
RIG-I-F	5' GCCAGAGTGTGAGAATCTCAGTCA 3'
RIG-I-R	5' GAGAACACAGTTGCCTGCTGCTCAT 3'
FAS-L-F	5' GAGAAGGAAACCCTTTCC 3'
FAS-L-R	5' ATATTCCTGGTGCCCATGAT 3'
DICER-F	5' CTTGACTGACTTGCCTCTG 3'
DICER-R	5' AATGGCACCAGCAAGAGACT 3'
DROSHA-F	5' CACCCACTCCAATAACAAGAGC 3'
DROSHA-R	5' CGTTGGTGTGGCATACTCC 3'
GAPDH F	5' GTTGTCTCCTGCGACTTCA 3'
GAPDH R	5' GGTGGTCCAGGGTTTCTTA 3'
β -actin F	5' CTGTCCCTGTATGCCTCTG 3'
β -actin R	5' ATGTCACGCACGATTTC 3'

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Expression Suite v1.0 (Applied Biosystems) e o software do projeto R com o pacote qPCR.Ct. As amostras foram comparadas e os resultados obtidos foram analisados por variância, sendo considerados

estatisticamente significantes valores de p iguais ou inferiores a 0,05. A quantificação da expressão de genes relacionados ao miRNA, Fas-1 e RIG-I foi baseada no ciclo thresholds (Cts) obtido, calculando-se $2^{-\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a ação dos miRNAs já tenha sido estudada no vírus da hepatite C (HCV) - que regula a replicação viral - e no vírus Epstein-Barr (EBV) - que inibe a resposta imune do hospedeiro, ainda há uma falta de informações sobre a regulação dos miRNAs na infecção por ZIKV (ZHUO et al. 2013; AZOUZ et al. 2019). No entanto, existem evidências de que os miRNAs desempenham um papel na replicação e propagação de vírus. A expressão ou direcionamento de miRNAs hospedeiros pode estar envolvida em respostas antivirais celulares. Na maioria das vezes, os miRNAs desempenham um papel nos ciclos de replicação de vírus e promovem a infecção por vias reguladoras complexas. Esses miRNAs também podem ser codificados por um genoma viral e expressos na célula hospedeira. Os miRNAs virais podem compartilhar sequências comuns com miRNAs hospedeiros ou ter sequências totalmente diferentes. Eles podem regular uma variedade de processos biológicos envolvidos na infecção viral, incluindo apoptose, evasão da resposta imune ou modulação da proliferação celular (MODHIRAN et al. 2015; BRUSCELLA et al. 2017; LI et al. 2017).

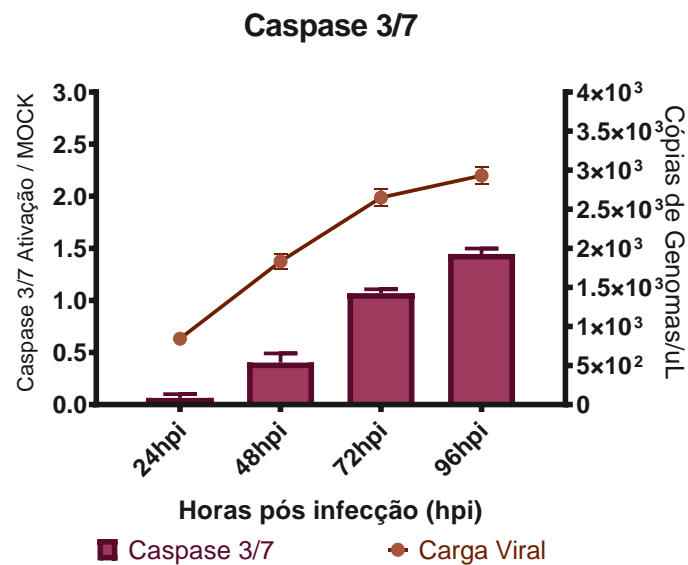
Foi relatado nas células pulmonares (A549) que há um aumento da carga viral em 96 hpi (FERREIRA et al. 2018). Este artigo também utilizou outras células: por exemplo, nas células hepáticas humanas (HepG2), a detecção de pico de carga viral ocorreu às 48 hpi e, nas células renais de ratos (MA104), às 72 hpi. No entanto, essa divergência já era esperada, pois já foi demonstrado em outros estudos que os flavivírus apresentam uma grande divergência em relação à sua velocidade de replicação em diferentes tecidos (GHOSH ROY et al. 2014).

Caspase 3/7 possuem um papel importante na via intrínseca da apoptose. Durante os eventos mitocondriais que levam à apoptose, a caspase 3 medeia a fragmentação do DNA e as alterações morfológicas celulares, enquanto a caspase 7 participa da perda da viabilidade celular e, juntas, essas caspases desempenham um papel crucial no processo apoptótico (LAKHANI et al. 2006). Outros autores também visualizaram uma relação direta da caspase 3 com a morte celular causada pelo ZIKV e a ativação das vias intrínseca

e extrínseca da apoptose (De SOUSA et al. 2018b). Ativações de outras caspases, como a caspase 1, também pode ser modificado por infecção viral (De SOUSA et al. 2018a).

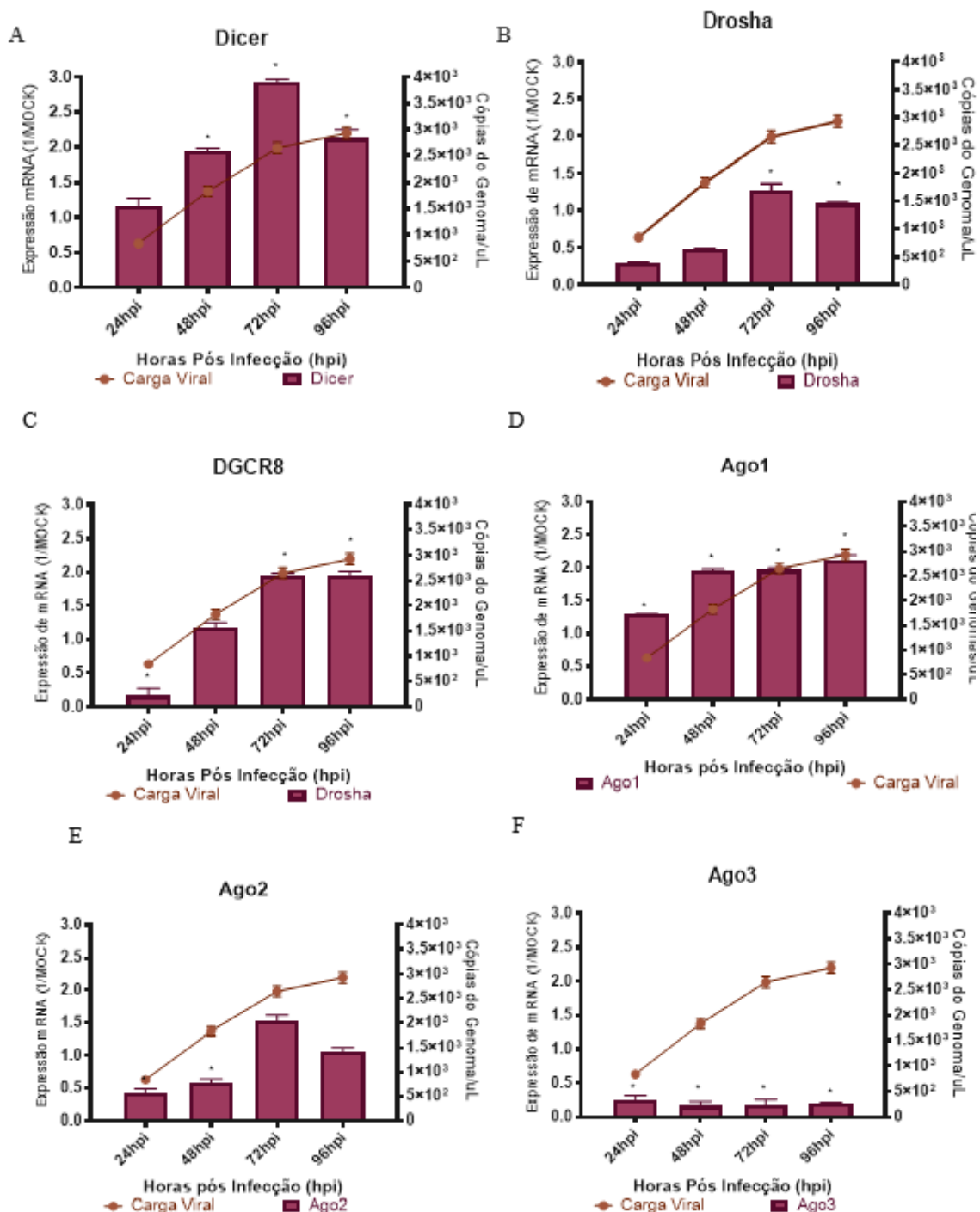
Em um estudo com linhagens celulares progenitoras neurais (NPCs) infectados com ZIKV, o efeito citopático e a ativação de caspases 3/7 foram mostrados em 24 hpi e os títulos virais aumentados em 48 hpi, seguidos de uma diminuição subsequente em 72 hpi (SOUZA et al. 2016). Por outro lado, no presente estudo com células N2A, a ativação das caspases 3/7 seguiu o aumento da carga viral, semelhante ao descrito anteriormente para o vírus da Febre Amarela (YFV) nas células hepáticas (HOLANDA et al. 2019) (Figura 1).

Figura 1 - Quantificação da ativação das caspases 3 e 7. Vias por fluorescência e quantificação da carga viral, por 24 a 96 hpi qRT-PCR durante a infecção em células N2A ZIKV. O valor da significância estatística aceitável é $p < 0,005$ em comparação com os grupos infectados com simulação.



Durante a infecção pelo ZIKV nas células N2A, todas as proteínas analisadas foram reguladas em excesso (Figura 2) - ao contrário da infecção pelo sorotipo 4 do vírus Dengue (DENV), na qual as proteínas de miRNAs biogênicas foram sub-reguladas nas células A549 (CASSEB et al. 2016). Outros estudos também comprovam a relação entre DGCR8 e Dicer durante a infecção por DENV e outros flavivírus, por regulação positiva ou negativa desses dois componentes celulares (CASTILLO; URCUQUI-INCHIMA 2016).

Figura 2 - A quantificação de ARNm da expressão de genes de miARN-relacionados em células N2A ZIKV-infectados por qPCR em comparação com a carga viral realizada por 24-96 hpi qRT-PCR e comparação com as células não infectadas. (A) Dicer, (B) Drosha, (C) DGCR8, (D) Ago1, (E) Ago2 e (F) Ago3; Várias diferenças entre os quatro dias da infecção pelo ZIKV não foram estatisticamente significativas, com os maiores níveis de expressão observados às 96 hpi, enquanto as diferenças na expressão dos genes que codificam Ago1 e DGCR8 foram estatisticamente significativas ($P < 0,0001$) quando comparadas. Os quatro dias de infecção das células não infectadas durante os dias de infecção. * Significado estatístico; $P < 0,0001$.



Em estudos publicados anteriormente, a expressão de mRNA de DGCR8 não seguiu a expressão de mRNA de Drosha, embora seja um cofator por sua funcionalidade. Durante

a infecção pelo genótipo YFV 2 nas células HepG2, houve uma expressão negativa de DGCR8, enquanto a expressão de Drosha não diminuiu significativamente (HOLANDA et al. 2017). No entanto, outros estudos propuseram que a expressão de Drosha é semelhante à expressão de DGCR8 nas células HepG2, como também observado no presente estudo em células N2A (JAFARI et al. 2013).

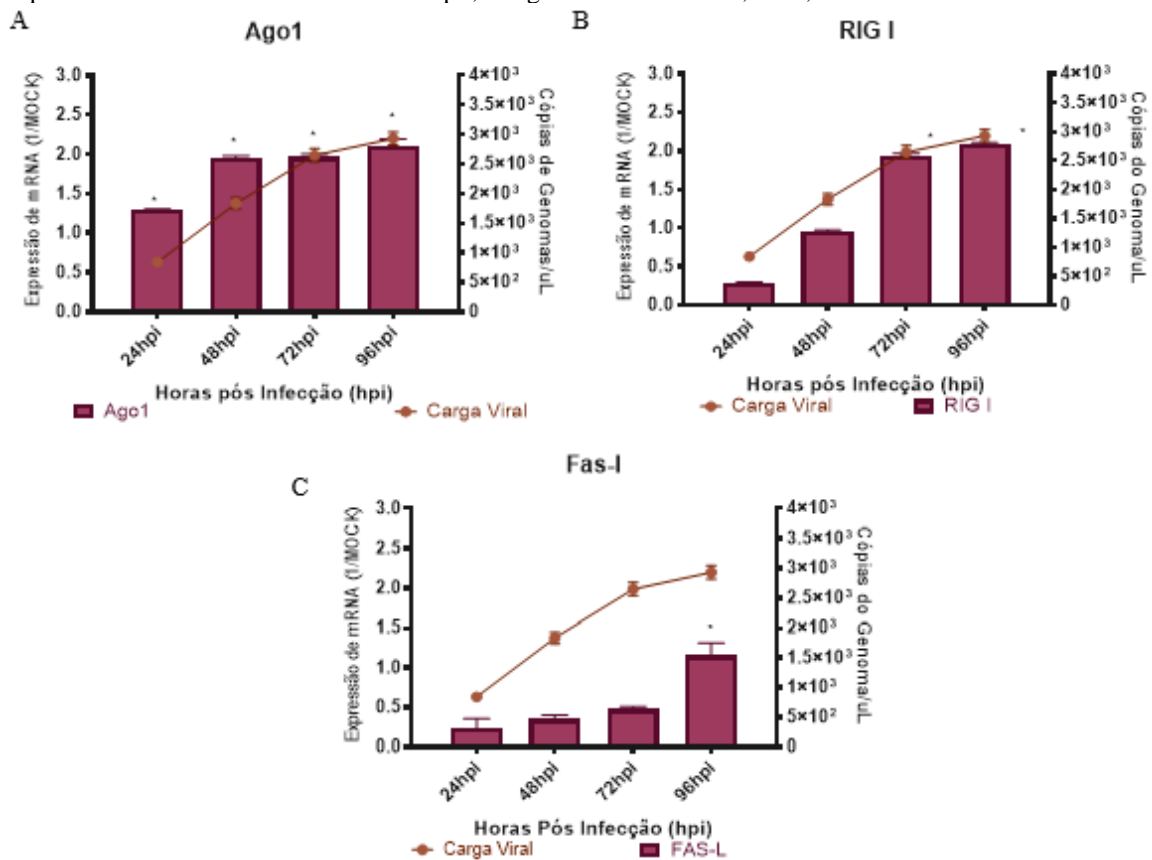
No presente estudo, a expressão do mRNA de Drosha aumenta durante as primeiras horas de infecção. Por outro lado, outros autores demonstraram que, nas células HepG2 infectadas pelo genótipo 1 ou 2 do YFV, o Drosha foi sub-regulado em relação à infecção, o que poderia estar relacionado ao aumento da replicação viral e da regulação positiva de citocinas (HOLANDA et al. 2017).

O papel da proteína Dicer foi descrito anteriormente na infecção pelo HCV como essencial para a replicação viral. Durante a replicação do vírus, é relatado que o hsa-miR-122 inibe a expressão do Dicer e, conseqüentemente, nenhum novo hsa-miR-122 é produzido e a replicação viral não é processada corretamente. Portanto, é possível que a expressão positiva de Dicer possa estar diretamente relacionada à replicação viral (RANDALL et al. 2007), como observado no presente estudo com a expressão de Dicer na infecção por ZIKV.

A proteína Ago1 é capaz de se ligar a RNAs curtos, como miRNAs ou siRNAs, e suprimir a tradução de mRNAs complementares a eles (ENDERMEISTER, 2010). Constatou-se que esta proteína estava regulada positivamente no presente estudo, sugerindo que o ZIKV pode atuar na tradução de seu mRNA.

Com relação ao Ago4, pouco se sabe sobre sua função nas células animais, mas nos vegetais, como os membros do gênero *Arabidopsis*, é conhecido por ser um fator importante para o sistema imunológico (RANDALL et al. 2007). O pico de sua expressão foi observado em 72 hpi, com uma diminuição subsequente, provavelmente associada ao aumento da carga viral (Figura 3) .

Figura 3 - Quantificação de qPCR da expressão de mRNA dos genes codificadores Ago4, RIG-I e Fas- I em células N2A infectadas por ZIKV em comparação com carga viral de 24 a 96 hpi . (A) Ago4, (B) RIG-I e (C) Fas- I. As diferenças nos níveis de expressão de RIG-I e FAS-L foram estatisticamente significativas ($p < 0,005$) entre os quatro dias de infecção por ZIKV comparadas às células não infectadas, sendo os níveis de expressão mais altos observados em 96 hpi ; * Significado estatístico; $P < 0,005$



O RIG-I é um receptor citoplasmático essencial para a detecção de RNA viral, especialmente para flavivírus, como DENV e ZIKV. O RIG-I possui dois ligantes N-terminais que, em conexão com o RNA viral, facilitam a ligação a proteínas MAVS, ativando importantes fatores de transcrição para a expressão e ativação de proteínas de caspases e IFN tipo 1 (CHAZAL et al. 2018).

A expressão de RIG-I em micróglia e astrócitos murinos primários é regulada positivamente durante a infecção pelo vírus da Estomatite Vesicular (VSV), como no presente estudo. Sugere-se que o RIG-I desempenhe papéis importantes na detecção de patógenos virais no sistema nervoso central, no início de respostas imunes protetoras e na progressão da inflamação no cérebro (FURR et al. 2008, 2010).

Durante a infecção pelo vírus Herpes Simplex (HSV) tipo 1, os níveis de RIG-I aumentam significativamente na microglia a partir de 24 hpi. Nos astrócitos, apesar da replicação viral mais lenta, existe uma regulação positiva sob vários MOIs (0,1, 1 e 10) a 48 hpi. A administração intracelular de beta-DNA causa elevações na expressão da proteína

RIG-I em microglia e astrócitos. Esses dados indicam que a expressão de RIG-I não é apenas auto-induzida por seu ligante, mas também pode ser regulada pela presença de DNA viral intracelular (CRILL et al. 2015).

Foi observado um aumento na expressão de RIG-I em 48 hpi e 96 hpi, quando há maior quantidade de vírus. Isso pode sugerir uma alta expressão do IFN tipo 1 e uma maior ativação da apoptose, o que pode estar relacionado ao aumento da ativação das caspases 3/7 (Figura 3).

O elemento FAS-L é identificado como fator associado a morte celular, participando da via de apoptose extrínseca. A SAF, quando associada ao domínio da morte (FADD) e à pró-caspase 8, forma o complexo de sinalização indutor da morte (DISC). A pró-caspase 8, por sua vez, é processada na caspase 8, que ativa e processa a pró-caspase 3 para formar a caspase 3 e, portanto, leva à apoptose (JORGENSEN et al. 2017). Portanto, a regulação positiva do FAS-L pelo ZIKV pode sugerir que o vírus é capaz de promover a ativação da via de apoptose extrínseca durante a infecção. Outros autores relataram que há também uma ativação da via intrínseca (ativação de FASL, FAS, BAX, BCL2 e RIP1), bem como a expressão de várias citocinas, como IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10, TGF- β e IL-33.

É possível constatar que a infecção ZIKV em células N2A modifica a expressão de proteínas importantes para o processo imunológico, para a apoptose (principalmente caspases 3/7), e proteínas envolvidas na biogênese de miARN (Dicer, Drosha, DGCR8, Ago1, Ago2, Ago3 e Ago4). É sugestivo que a formação de miRNAs pode influenciar diretamente a expressão de caspases e produção de citocinas. Além disso, mostramos que a infecção viral pode modificar a expressão de receptores importantes para a detecção de RNA viral (RIG-I) e receptores importantes para a ativação em via de apoptose (FAS-L).

REFERÊNCIAS

AZOUZ F, ARORA K, KRAUSE K, ET AL (2019) **MicroRna integrado e perfil de mRNA em neurônios infectados pelo vírus zika.** V. 11: p. 1–22. DOI: 10.3390 / V11020162

BHAT PV, PANDAREESH MD, KHANUM F, TAMATAM A. **Os resultados citotóxicos da ocratoxina a nas células neuro-2a: papel do estresse oxidativo evidenciado pela n-acetilcisteína.** (AU), 2016. DOI: 10.3389 / FMICB.2016.01142

BRUSCELLA P, BOTTINI S, BAUDESSON C, et al (2017) **Vírus e miRNA's: mais amigos do que inimigos.** FRENTE. MICROBIOL. 8: 1–11

CASSEB SMM, SIMITH DB, MELO KFL, ET AL. **Os mRNA's drosha, dgcr8 e dicer são sub-regulados em células humanas infectadas pelo vírus da dengue 4 e desempenham um papel na patogênese viral.** Genet Mol Res 15:. DOI: 10.4238 / GMR.15027891

URCUQUI-INCHIMA S. **Drosha, dgcr8 e dicer são regulados negativamente em células humanas infectadas com gmr . 15027891 - o mrna de d rosha, dicer e trbp são regulados negativamente em células vero com a utr 3 'do vírus da dengue.** Genet Mol Res 15, 2016.

CHAZAL M, BEAUCLAIR G, GRACIAS S, ET AL (2018) **Rig-i reconhece a região 5 'da região dos genomas do vírus da dengue e zika.** Cell Rep 24: 320–328. DOI: 10.1016 / J.CELREP.2018.06.047

CRILL E, FURR-ROGERS S, MARRIOTT I. **Rig-i é necessário para a produção de citocinas induzidas por vsv por glia murina e atua em combinação com DAI para iniciar respostas ao hsv-1.** Glia 63: p. 2168–2180, 2015 DOI: 10.1002 / GLIA.22883

CROCE CM. **Causas e conseqüências da desregulação do microrna no câncer.** Nat Rev Genet 10: 704-714, 2009. DOI: 10.1016 / J.SURG.2006. 10.010.USE

DE SOUSA JR, AZEVEDO R DO S DA, MARTINS FILHO AJ, et al. **A ativação do inflamassoma in situ resulta em graves danos ao sistema nervoso central em casos**

fatais de microcefalia do vírus zika. Cytokine 111: 255–264. 2018. DOI: 10.1016 / J.CYTO.2018.08.008

DE SOUSA JR, AZEVEDO RSS, MARTINS FILHO AJ, et al. **Correlação entre apoptose e resposta imune in situ em casos fatais de microcefalia causada por vírus zika.** Am J Pathol 188: 2644–2652. 2018 (b). DOI: 10.1016 / J.AJPATH.2018.07.009

DHEIN J, WALCAZK H, BAUMLER C, ET, **Suicídio de jurkat via fas-fasl.** Nature 373: 438–441, 1995.

ENDER C, MEISTER G. **Proteínas de argonaute em resumo.** J Cell Scie. v. 23: 1819-1823. 2010. DOI : 10.1242 / JCS.098343

FERREIRA R, HOLANDA GM, SILVA EP, et al. **O zika vírus altera o perfil de expressão de genes relacionados ao microrna nas linhagens de células hepáticas, pulmonares e renais.** Immunol Viral 00: 1–6. 2018. DOI: 10.1089 / VIM.2017.0186

FURR SR, CHAUHAN VS, JR DS, ET AL. **Caracterização da expressão do gene i induzível pelo ácido retinóico na glia primária de murino após exposição ao vírus da estomatite Vesicular.** J Neurovirol. v.14. 2008.. DOI: 10.1080 / 13550280802337217

FURR SR, MOERDYK-SCHAUWECKER M, GRDZELISHVILI VZ, MARRIOTT I. **RIG-I medeia as respostas imunológicas não inflamatórias induzidas por vírus de rna de sentido negativo não segmentadas de astrócitos humanos.** Glia. v. 58: 1620-1629. 2010. DOI: 10.1002 / GLIA.21034

GHOSH ROY S, SADIGH B, DATAN E, et al. **Regulação da sobrevivência e morte celular durante infecções por flavivírus.** World J Biol Chem. v.5: p. 93-105. DOI: 10.4331 / WJBC.V 5.I 2,93

HO LJ, WANG JJ, SHAIQ MF, et al. **a infecção de células dendríticas humanas pelo vírus da dengue causa maturação celular e produção de citocinas.** J immunol 166: 1499–1506. 2001. DOI: 10.4049 / JIMMUNOL.166.3.1499

HOLANDA GM, CASSEB SMM, QUARESMA JAS, ET AL. **O vírus da febre amarela modula a expressão do mrna de citocinas e induz a ativação da caspase 3/7 na linha**

celular de hepatocarcinoma humano hepg2. Arch Virol 164: 1187-1192. 2019. DOI: 10.1007 / S00705-019-04171-7

HOLANDA GM, MANSOUR S, CASSEB M, et al. **O vírus da febre amarela modula a expressão de proteínas-chave relacionadas à via do microrna na linha celular humana de hepatocarcinoma hepg2.** Immunol Viral. v. 30, p. 1–6. 2017 DOI: 10.1089 / VIM.2016.0149

JAFARI N, PEERI DOGAHEH H, BOHLOOLI S, et al. **Níveis de expressão de componentes de máquinas de microrna drosha, dicer e dgcr8 em linhas de células humanas (ags, hepg2 e keyse-30).** Int J Clin Exp Med v.6: p. 269–274. 2013.

JORGENSEN I, RAYAMAJHI M, MIAO EA. **Morte celular programada como defesa contra infecção a gsdmd forma um poro nas membranas.** Nat Rev Immunol. v.17: p. 151–164. 2017. DOI: 10.1038 / NRI.2016.147

KAVURMA MM, KHACHIGIAN LM. **Sinalização e controle transcricional da expressão do ligante fas. A morte celular difere,** V. 10: 36–44. 2003. DOI: 10.1038 / SJ.CDD.4401179

LAKHANI S, MASUD A, KUIDA K, et al. **CASPASES 3 E 7: Mediadores-chave de eventos mitocondriais de apoptose.** Science, v. 311, p. 847-851. 2006. DOI: 10.1126 / SCIENCE.1115035

LI Q, LOWEY B, SODROSKI C, ET AL, **As redes celulares de microrna regulam a dependência do hospedeiro da infecção pelo vírus da hepatite c.** Nat commun, v. 8 DOI: 10.1038 / S41467-017-01954-X

LINDENBACH BD, RICE CM. **Trans-complementação do vírus da febre amarela ns1 revela um papel na replicação precoce do RNA.** J Virol, v. 71: p. 9608–9617

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. **Análise de dados relativos à expressão gênica usando pcr quantitativa em tempo real e o método ct 2- ΔΔ,** Métodos v. 25: p. 402-408. 2001. DOI: 10.1006 / MET.2001.1262

MELO CA, MELO AS, **Biogênese e fisiologia de micrornas: RNAs não codificantes e câncer.** p. 5-25. 2014.

MODHIRAN N, WATTERSON D, MULLER DA, ET AL. **A proteína ns1 do vírus da dengue ativa células via receptor toll-like 4 e interrompe a integridade da monocamada celular endotelial.** Sci Transl Med. v. 7: p. 304-42. 2015. DOI: 10.1126 / SCITRANSLMED.AAA3863

RANDALL G, PANIS M, COOPER JD, et al. **Cofatores celulares que afetam a infecção e replicação do vírus da atite hepática c.** Proc Natl Acad Sci Usa v. 104: p. 12884–9. 2007. DOI: 10.1073 / PNAS.0704894104

RICARTE J, KIMURA et. **MICRORNAS: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer.** Arq Bras Endocrinol Metabol 50: 1 102–1107. 2017.

SHAN C, XIE X, MURUATO AE, et al. **Um clone de cDNA infeccioso do vírus zika para estudar a virulência viral, a transmissão de mosquitos e os inibidores antivirais.** Cell Host Microbe v. 19: p. 891–900. 2016. DOI: 10.1016 / J.CHOM.2016.05.004

SOUZA B, SAMPAIO G, PEREIRA C, et al. **A infecção pelo vírus zika induz alterações na mitose e morte celular apoptótica de células progenitoras neurais humanas.** Sci Rep v. 6: p. 1–13. DOI: 10.1038 / SREP39775

TANG H, HAMMACK C, OGDEN SC, et al, **O vírus zika infecta precursores neurais corticais humanos e atenua seu crescimento.** Cell Stem Cell v. 18: p. 587-590. 2016. DOI: 10.1016 / J.STEM.2016.02.016.ZIKA

OMS. **MICROCEFALIA.** 2018 [HTTPS://WWW.WHO.INT/EN/NEWS-ROOM/FACT-SHEETS/DETAIL/MICROCEPHALY](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly)

WU SJ, GROUARD- VOGEL G, SUN W, et al. **As células de langerhans da pele humana são alvos da infecção pelo vírus da dengue.** Nat Med 6: 816–20. 2000. DOI: 10.1038 / 77553

ZEIDNER NS, HIGGS S, HAPP CM, et al. A alimentação por mosquitos modula as citocinas th1 e th2 em camundongos suscetíveis a flavivírus: efeito imitado pela injeção de sialocininas, mas não demonstrado em camundongos resistentes a flavivírus. Parasite Immunol, v. 21: 35–44. 1999. DOI: 10.1046 / J.1365-3024.1999.00199.X

ZHUO Y, GAO G, SHI JA, ET AL. Mirnas: biogênese, origem e evolução, funções na interação vírus-hospedeiro. Cell Physiol Biochem. v. 32: p. 499-510. DOI: 10.1159 / 000354455