



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TAISSA RICCIARDI JORGE

**RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE DURANTE A INFECÇÃO POR *FLAVIVIRUS*:  
CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS**

FLORIANÓPOLIS

2021

TAISSA RICCIARDI JORGE

**RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE DURANTE A INFECÇÃO POR *FLAVIVIRUS*:  
CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do grau de  
Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur

Florianópolis  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Jorge, Taissa Ricciardi

Resposta celular ao estresse durante a infecção por  
Flavivirus: causas e consequências / Taissa Ricciardi  
Jorge ; orientador, Daniel Santos Mansur, 2021.  
65 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. virologia. 3. imunologia. 4.  
biologia celular. 5. biologia molecular. I. Mansur, Daniel  
Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

TAISSA RICCIARDI JORGE

**RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE DURANTE A INFECÇÃO POR *FLAVIVIRUS*:  
CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza  
Escola de Ciências da Saúde e da Vida - PUCRS

Profa. Dra. Andrea Thompson Da Poian  
Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis - UFRJ

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho  
Departamento de Farmacologia - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel Prediger  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur  
Orientador

Florianópolis, 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço às agências de fomento, à UFSC e ao programa de pós-graduação em farmacologia por viabilizarem meu doutoramento.

Agradeço o Prof. Dr. Daniel Santos Mansur, por me aceitar em sua equipe e confiar em mim no desenvolvimento desse e outros projetos. Também por me mostrar que supervisão com respeito, responsabilidade e estímulo à curiosidade do aluno é possível.

Agradeço o Prof. Dr. Brian Ferguson por me aceitar em sua equipe e pela preciosa mentoria que me ofereceu durante meu tempo em seu laboratório.

Agradeço a Dra. Nerea Irogoyen pela generosa colaboração fundamental para a finalização deste trabalho.

Agradeço diversos pesquisadores e laboratórios colaboradores que cederam seu tempo e/ou reagentes e/ou equipamentos para a realização deste e outros trabalhos nos quais me envolvi durante o doutoramento: Dr. Aristóbolo Mendes da Silva, Dra. Luciana Barros de Arruda, Dr. Marco Augusto Stimamiglio, Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha, Dr. Edgar Gonzalez-Kozlova, Dra. Gabriela Luiz, Dr. Trevor Sweeney, Laboratório de Protozoologia (UFSC), Ferguson Lab (University of Cambridge), Irogoyen Lab (University of Cambridge), Smith Lab (University of Cambridge), Laboratório de Virologia Molecular (Fiocruz-PR) e Lab Câncer (UFSC), LAMEB/UFSC, LCME/UFSC.

Agradeço aos alunos e pós-docs do LiDI, Ferguson Lab e Smith Lab pelo coleguismo quase diário. E agradeço amigos e colegas fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional durante o doutoramento, dentre os quais nomeio: Adara A., Adriana C., Andrea S., Anja S., Alice T., Carime L., Daniel P., Dayana H., Dina B., Edgar K., Evigeniya S., Greicy M., Helena T., Lucilene G., Marcel T., Marick S. e Murilo D.

Agradeço o suporte dos meus amigos pessoais mais queridos que me ajudaram muito nessa jornada: Andrea S., Claudio M., Dayana H., Eduardo Z., Jake G., Luana M., Lucas C., Lucas R., Marcel T., Marick S. e Sheila A.

Por fim, mas não menos importante, agradeço o apoio e amor incondicional da minha família: meus irmãos Benny e Sofia; minha madrinha Ângela; mas, sobretudo, meus pais, Alice e Helder, que se sacrificaram enormemente para garantir que seus três filhos tivessem acesso à melhor educação. De todos os privilégios que a vida me deu, ter nascido filha deles foi sem dúvida o mais importante para permitir o meu doutoramento e todas as minhas outras conquistas.

## RESUMO

O gênero *Flavivirus* contém os agentes causadores de algumas das doenças arbovirais mais comuns em todo o mundo. No entanto, o desenvolvimento de vacinas e medicamentos específicos para esses vírus continua desafiador, em parte devido à falta de conhecimento de como esses vírus interagem com suas células hospedeiras. O genoma dos flavivírus é um único ssRNA (+) e contém um cap 5' e uma única fase aberta de leitura que codifica para uma poliproteína. Dada a estrutura do genoma, considera-se que sua tradução ocorre de forma canônica dependente de cap. Apesar disso, uma tradução cap-independente foi relatada, cujo mecanismo ainda permanece controverso. Para entender melhor essa tradução alternativa, começamos investigando qual condição levaria o vírus a uma tradução independente de cap. Uma forma comum de controle sobre a maquinaria de tradução celular é pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) que promove a interrupção da tradução em resposta a diferentes estressores. Essa resposta é coordenada por quatro quinases que compõem a chamada Resposta Integrada ao Estresse (ISR). Usando células A549 infectadas com DENV4 e ZIKV como modelo, pudemos detectar p-eIF2 $\alpha$  após 12 hpi com um pico em 24 hpi e declínio lento depois. Linhagens celulares *knockout* geradas por CRISPR/Cas9 mostraram que este fenótipo é dependente de PKR, um sensor ISR de dsRNA, e é independente de IFN-I. Outras investigações revelaram que o ZIKV escapa da parada da tradução induzida por p-eIF2 $\alpha$ . Surpreendentemente, a replicação de ambos os vírus foi prejudicada nas células PKR<sup>-/-</sup>. Este prejuízo foi demonstrado pelo título viral e tamanho da placa, mas não pela quantificação do genoma viral. Essa descoberta contraintuitiva indica que esse vírus pode ter cooptado a via PKR-eIF2 $\alpha$  para sua replicação. Finalmente, os ensaios com repórteres de luciferase da atividade 5'UTR do ZIKV indicaram que esta região do genoma viral confere uma vantagem translacional quando sob estresse celular. Juntos, esses resultados sugerem a tradução alternativa viral como um mecanismo de evasão que coopta a resposta ao estresse celular para replicação viral ideal. As investigações em andamento visam agora determinar o mecanismo de tradução que ocorre na presença de p-eIF2 $\alpha$ .

**Palavras-chave:** *flavivirus; dengue; zika, vírus; estresse celular; resposta integrada ao estresse; eIF2 $\alpha$ ; tradução; interação vírus-hospedeiro; cap*

## ABSTRACT

The *Flavivirus* genus contains the causative agents of some of the most common arboviral diseases worldwide. However, the development of specific vaccines and drugs for these viruses remain challenging partly due to the lack of knowledge of how these viruses interact with their host cells. Flaviviruses' genome is a single ssRNA(+) and contains a 5' cap and a single open reading frame that encodes for a polyprotein. Given the genome structure, its translation is considered to happen by the canonical cap-dependent way. Despite that, a cap-independent translation has been reported, whose mechanism remains controversial. To better understand this elusive alternative translation we started by investigating which condition would drive the virus to a cap-independent translation. A common way of control over the cellular translation machinery is through the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) that promotes translation arrest in response to different stressors. This response is coordinated by four kinases that compound the so-called Integrated Stress Response (ISR). Using A549 cells infected with DENV4 and ZIKV as a model, we could detect p-eIF2 $\alpha$  after 12 hpi with a peak at 24 hpi and slow decline afterwards. CRISPR/Cas9-knockout cell lines showed that this phenotype is dependent on PKR, an ISR sensor of dsRNA, and is independent of IFN-I. Further investigations revealed that ZIKV escapes the translation arrest induced by p-eIF2 $\alpha$ . Surprisingly, the replication of both viruses was impaired in PKR<sup>-/-</sup> cells. This impairment was shown by viral titre and plaque size but not by viral genomic quantification. This counterintuitive finding indicates that this virus may have co-opted the PKR-eIF2 $\alpha$  pathway for its replication. Finally, assays with luciferase reporters of ZIKV 5'UTR activity indicated that this region of the viral genome confers a translational advantage under cell stress. Together these results suggest the viral alternative translation as an evasive mechanism that co-opts the cell stress response for optimal viral replication. Ongoing investigations aim now to determine the translation mechanism that takes place in the presence of p-eIF2 $\alpha$ .

**Keywords:** *flavivirus; dengue; zika, virus; cell stress; integrated stress response; eIF2 $\alpha$ ; translation; virus-host interaction; cap.*

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. Objetivo</b> .....	10
1.1.1. Objetivos específicos.....	10
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1. Tradução celular</b> .....	11
2.1.1. Vias alternativas de iniciação da tradução .....	12
2.1.2. Tradução sob estresse .....	13
<b>2.2. <i>Flavivirus</i></b> .....	15
2.2.1. Vírus de importância global .....	15
2.2.2. Estrutura e replicação viral .....	17
2.2.3. Tradução das proteínas virais .....	18
<b>2.3. Resposta autônoma ao estresse na imunidade antiviral</b> .....	19
2.3.1. Resposta integrada ao estresse .....	20
2.3.1.1. PKR.....	22
2.3.1.2. PERK.....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. Linhagens celulares e virais</b> .....	25
<b>3.2. Infecções virais</b> .....	25
<b>3.3. Produção de linhagens celulares “knockout”</b> .....	26
<b>3.4. Transfecção de poly(I:C)</b> .....	27
<b>3.5. Protocolo de marcação com puromicina</b> .....	27
<b>3.6. Immunoblots</b> .....	28
<b>3.7. Imunofluorescências</b> .....	28
<b>3.8. Citometrias de fluxo</b> .....	29
<b>3.9. Análise de expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	30
<b>3.10. Ensaio com repórteres de luciferase</b> .....	30
<b>3.11. Teste de viabilidade celular por MTT</b> .....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1. Modelo experimental</b> .....	32
<b>4.2. Ativação da ISR por DENV e ZIKV</b> .....	32



4.3. A fosforilação de eIF2 $\alpha$ durante a infecção por DENV/ZIKV é majoritariamente dependente de PKR e independente de IFN-I .....	34
4.4. PKR não é bloqueada por DENV ou ZIKV, mas apresenta reconhecimento tardio do dsRNA viral .....	37
4.5. A deleção de PKR afeta a expressão de genes e proteínas dependentes de eIF2 $\alpha$ durante as infecções por DENV4 e ZIKV .....	39
4.6. DENV, mas não ZIKV, promove a parada da tradução em células infectadas.....	40
4.7. A supressão da via PKR-eIF2 $\alpha$ prejudica a replicação de DENV e ZIKV .....	43
4.8. A deleção de PKR não afeta significativamente a resposta imune inata ou sobrevivência celular.....	44
4.9. Investigação da leitura de uORFs na extremidade 5' UTR do ZIKV ...	46
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	51
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES .....	61
Apêndice A - Listas de reagentes e materiais usados .....	61
Apêndice B - Figuras suplementares .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Flavivirus* contém os agentes causadores de algumas das doenças virais transmitidas por vetores mais comuns em todo o mundo (SHEPARD et al., 2011). No entanto, o desenvolvimento de vacinas e medicamentos específicos para esses vírus tem se mostrado particularmente desafiador. Faz-se então necessário entender melhor a biologia viral, de forma a permitir o desenvolvimento de estratégias antivirais inéditas.

O genoma dos flavivírus é composto por uma única fita de ssRNA(+) que contém um cap 5' e uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma poliproteína. Dada a estrutura do genoma, considera-se que sua tradução ocorra pela via canônica dependente de cap (CHAMBERS et al., 1990). Apesar disso, alguns trabalhos reportaram a possibilidade de uma tradução alternativa, independente do cap 5' mas cujo mecanismo permanece controverso (EDGIL et al., 2006; SONG et al., 2019). Estes relatos foram o elemento gerador da hipótese principal deste trabalho, na qual se postulou que a tradução alternativa dos flavivírus seria um mecanismo de escape de um controle celular da maquinaria de tradução.

As principais vias de controle sobre a maquinaria de tradução são: (i) a desfosforilação de 4E-BP, que sequestra o fator de iniciação da tradução que reconhece o cap 5' (eIF4E); ou (ii) a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , que impede a reciclagem deste fator para participação em novas traduções (MOHR; SONENBERG, 2012). O segundo mecanismo é particularmente bem explorado na literatura e abundam relatos de sua ativação durante a replicação dos flavivírus.

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) é coordenada por quatro quinases que funcionam como sensores de diferentes estressores celular, e compõem a chamada Resposta Integrada ao Estresse (ISR). São elas: (i) HRI, ativada por estresse oxidativo e/ou deficiência de heme; (ii) PKR, ativada por dsRNA; (iii) PERK, ativada por estresse de retículo; e GCN2, (iv) ativada por privação de aminoácidos. A ISR é, portanto, capaz de detectar infecções virais de forma direta (detecção de dsRNA) ou indireta (estresses estruturais ou metabólicos). Além do controle sobre a tradução celular, a ISR também apresenta “*crosstalk*” com as vias de sinalização de IFN, inflamação, autofagia, apoptose e outras, funcionando assim como uma segunda linha da imunidade inata da célula.

O controle da tradução como resposta antiviral é particularmente estratégico uma vez que todos os vírus dependem da maquinaria celular para síntese de suas proteínas. Por outro lado, dada a natureza de parasitas intracelulares obrigatórios dos vírus sua evolução caminha necessariamente em paralelo com a de seus hospedeiro impulsionando o aparecimento de diversas estratégias por ambos os lados para suplantar um ao outro. Por isso é esperado que diversos vírus que infectam com sucesso células eucarióticas disponham de mecanismos para lidar com o bloqueio da tradução induzidos pela ativação da ISR.

Sendo assim, foi proposto para este trabalho investigar a participação da ISR no mecanismo cap-independente para tradução do genoma de *Flavivirus*.

## 1.1. Objetivo

Investigar a participação da resposta integrada ao estresse no mecanismo cap-independente para tradução do genoma de *Flavivirus*.

### 1.1.1. Objetivos específicos

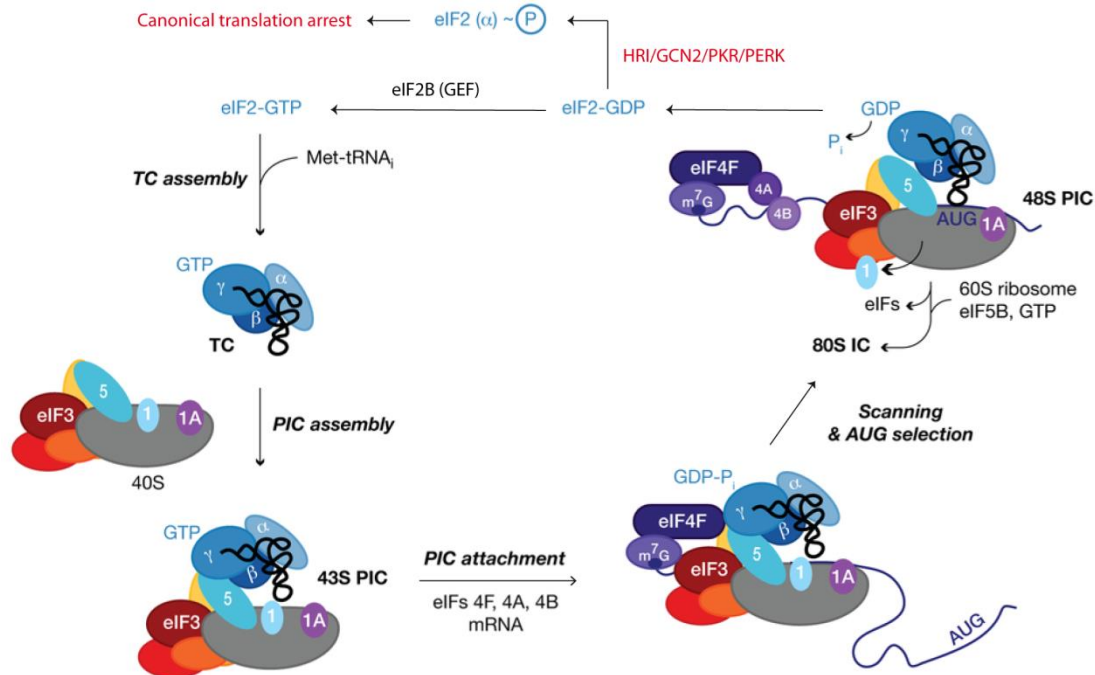
- Caracterizar a ativação da ISR durante a infecção por DENV e/ou ZIKV
- Determinar as quinases responsáveis pela ISR com linhagens KO produzidas por CRISPR-Cas9
- Caracterizar as linhagens KO relevantes por expressão gênica e proteica e perfil de sobrevivência durante a infecção, sempre em comparação com a linhagem parental
- Investigar a participação de sinalização por IFN-I no fenótipo observado
- Investigar mecanismos alternativos para tradução do genoma viral que possam ser influenciadas pela ISR (e.g IRES, uORF, etc.)

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Tradução celular

Em eucariotos o mecanismo de tradução, pelo qual proteínas são sintetizadas partir dos mRNAs, é altamente complexo e regulado pela participação de diversas proteínas e cofatores. A regulação da tradução permite à célula se adaptar a diversas condições externas e internas, priorizando algumas proteínas a serem produzidas em um controle pós-transcricional. Dentre as etapas desse processo, a iniciação da tradução é a mais complexa e regulada (ALBERTS et al., 2007; MOHR; SONENBERG, 2012).

**Figura 1 – Esquema da iniciação da tradução.** eIF: fator (eucariótico) de iniciação da tradução; GEF: fator de troca de nucleotídeo de guanina; PIC: Complexo de pré-iniciação da tradução; TC: complexo terciário; HRI/GCN2/PKR/PERK: quinases da resposta integrada ao estresse.



FONTE: adaptado de (HINNEBUSCH et al., 2016)

A via canônica de iniciação da tradução acontece dependente de diversos fatores de iniciação (eIF do inglês “*eukaryotic (translation) initiation factor*”) e de duas estruturas presentes nas extremidades dos mRNAs: o cap 5’, e a cauda poliadenilada 3’ (Figura 1). Para a iniciação há formação de dois complexos:

- **eIF4F**: eIF4E (que reconhece e interage com o cap 5'), eIF4G (plataforma para interação das diversas proteínas), eIF4A (RNA helicase), PABP (“*poly(A)- binding protein*”) e eIF3;
- **PIC** (do inglês “preinitiation complex”) ou 43S: subunidade ribossomal 40S ligada a eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5 e ao complexo terciário (TC) formado por eIF2-GTP–Met–tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>.

O eIF4F permite a localização do PIC no início do mRNA, pela interação do eIF3 comum aos dois complexos. O PIC então varre o mRNA até encontrar o primeiro códon de iniciação em contexto. O códon de iniciação canônico é o AUG, mas seus nucleotídeos adjacentes (contexto) têm forte influência no seu reconhecimento. A sequência adjacente consenso para um contexto forte, conhecida como sequência de Kozak, é 5'CGCC(**AUG**)CCA**UUG**3', sendo os nucleotídeos nas posições -3 e +4 (negrito) os mais importantes. O reconhecimento códon de iniciação com o anticódon de tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> do TC/PIC promove a hidrólise de GTP ligado ao eIF2 que se desliga do complexo estabilizando-o e permitindo a ligação da subunidade maior do ribossomo (60S) que dá início a tradução *in situ* (ALBERTS et al., 2007; HINNEBUSCH, 2011).

O fim da tradução acontece pela presença de códons de parada e é auxiliado por diversas proteínas e cofatores (BERTRAM et al., 2001). A terminação da elongação do peptídeo é seguida pela reciclagem dos componentes da maquinaria para iniciar nova tradução. A separação das subunidades ribossomais é auxiliada por ABCE1 (PISAREV et al., 2010). Já a troca do GDP associado a eIF2 por GTP é realizado por eIF2B, permitindo nova incorporação no PIC (KRISHNAMOORTHY et al., 2001).

### 2.1.1. Vias alternativas de iniciação da tradução

Há, no entanto, diversas possibilidades de modificações sobre a via canônica acima descrita, que dispensam a participação de um ou mais componentes da maquinaria citada. As alterações normalmente se concentram sobre a iniciação da tradução e são utilizadas tanto por mRNAs celulares quanto exógenos. Mecanismos de iniciação da tradução independente do complexo eIF4F são bastante comuns. Um primeiro exemplo, demonstrado *in vitro* e *in vivo*, é a possibilidade da substituição de eIF4E por eIF3d no reconhecimento do cap 5' (PESTOVA; KOLUPAEVA, 2002; LEE et al., 2016).

Outros mecanismos que dispensam o complexo eIF4F estão relacionados a estruturas e/ou modificações do RNA que fornecem pontos de interação diferenciados com eIFs. Este é o caso da metilação tipo “*N6-methyladenosine*” ( $m^6a$ ) que interage com METTL3 e, com ajuda de ABCF1, recruta a maquinaria de iniciação da tradução de forma independente do complexo eIF4F mas dependente do cap 5’ (COOTS et al., 2017). Já os IRESs (“*internal ribosome entry site*”) são um exemplo clássico de tradução que dispensam tanto o cap 5’ quanto o complexo eIF4F. Há cinco tipos de IRES conhecidos, que requerem diferentes conjuntos de eIFs para funcionarem (JACKSON et al., 2010). Em comum todos apresentam a capacidade de recrutar PIC independentemente da extremidade 5’ do mRNA e, por isso, o experimento padrão-ouro para caracterizar um IRES é posicioná-lo no meio de um mRNA bicistrônico (TERENIN et al., 2017). Por fim, o conceito de CITE (“*cap-independent translation enhancers*”), inicialmente descrito em plantas e recentemente proposto também para mamíferos, é outro mecanismo independente do cap 5’, mas ainda não bem caracterizado (TERENIN et al., 2013; SHATSKY et al., 2018).

A reiniciação (REI) é um evento que pode ocorrer ao fim da síntese peptídica, quando há um bloqueio total ou parcial do processo de reciclagem. Neste caso, um novo códon de iniciação a jusante ou a montante ao códon de parada do peptídeo anterior pode dar início a tradução de uma nova sequência nucleotídica que não necessariamente está na mesma fase de leitura da anterior (SKABKIN et al., 2013; YOUNG et al., 2015; GUNIŠOVÁ et al., 2018).

Por fim, outros códons também podem dar início a tradução ao invés do canônico AUG. São códons “*near-cognates*”, tais como CUG e UUG que codificam para leucina, iniciando, portanto, a tradução com  $tRNA^{Leu}$  e dispensando o TC (STARCK et al., 2012). O processo de reconhecimento de AUG em contexto é fortemente dependente de eIF1, e a diminuição dos níveis deste fator favorecem a tradução por códons de iniciação alternativos (PESTOVA et al., 1998; PESTOVA; KOLUPAEVA, 2002; HINNEBUSCH, 2011; FIJAŁKOWSKA et al., 2017).

### 2.1.2. Tradução sob estresse

Um dos mecanismos de regulação da iniciação da tradução mais estudados é a fosforilação da subunidade  $\alpha$  do eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) por quatro diferentes quinases que fazem parte da resposta integrada ao estresse (“*integrated stress response*”, ISR).

Detalhes sobre a ISR serão vistos em seção posterior, enquanto nesta será visto como a ISR afeta a tradução.

A fosforilação do eIF2 $\alpha$  (S51) aumenta sua afinidade por eIF2B, inibindo a atividade GEF (“*guanine nucleotide exchange factor*”) deste e com isso inviabilizando sua própria reciclagem para incorporação em TC (KRISHNAMOORTHY et al., 2001) (Figura 1). A limitação de TC inibe a via canônica de iniciação da tradução, mas alguns mecanismos alternativos permanecem inalterados ou são até mesmo facilitados. Este é o caso de mRNAs contendo m<sup>6</sup>A, uma vez que a proteína ABCF1 facilita o recrutamento dos escassos TCs (COOTS et al., 2017). Também seriam favorecidos mRNAs controlados por alguns tipos de IRES (“*HCV-like*”) que dispensam a etapa de varredura pelo códon de iniciação. Neste caso, a entrega do Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> é feita por eIF5B (TERENIN et al., 2008).

A função de eIF2 também parece poder ser substituída por eIF2D sob determinadas condições. O eIF2D (previamente identificado como “*Ligatin*”) contém um domínio (SUI1) em comum com eIF1, fator necessário para o reconhecimento do códon de iniciação. Ele seria capaz de entregar não somente o Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, mas também fatores de alongação sem requerer hidrólise de GTP (DMITRIEV et al., 2010). Um estudo apontou que eIF2D pode exercer essa função sozinho ou em combinação com MCT-1 e DENR particularmente em evento de reiniciação (SKABKIN et al., 2010). E, um trabalho recente confirmou a exigência de eIF2D e DENR para a tradução de alguns mRNAs durante ativação da ISR (VASUDEVAN et al., 2020).

Mas, os mecanismos de tradução mais bem caracterizados sob p-eIF2 $\alpha$ , envolvem mRNA contendo “upstream open reading frames” (uORFs) (HARDING et al., 2000; YOUNG; WEK, 2016). A regulação da tradução por uORFs é mecanismo conservado em eucariotos desde de leveduras, mas a seguir serão dados exemplos de genes de mamíferos.

Um mecanismo pelo qual uORFs podem regular a tradução proteica sob estresse é pelo atraso da reiniciação (“*delayed translation reinitiation*”). O exemplo clássico é a regulação do ATF4, fator de transcrição que promove a expressão de genes que ativam vias de resolução do estresse celular. Sua 5'UTR (“*untranslated region*”) contém uma uORF(1) curta e outra uORF(2) longa que se sobrepõem à ORF principal em outra fase de leitura. Sob condições normais a uORF1 é capaz de iniciar a tradução e, ao fim desta, a reiniciação permite a tradução da uORF2. Desta forma a uORF2 reprime a leitura de ORF principal. No entanto, sob baixas concentrações de

TC, a reiniciação demora mais para acontecer favorecendo a montagem do ribossomo a jusante a uORF2 e, conseqüentemente, promovendo a leitura da ORF principal (VATTEM; WEK, 2004).

Outro mecanismo é o “*ribosome bypass*” exemplificado pela tradução do GADD34, cofator da fosfatase PP1. Em humanos sua 5'UTR contém duas uORFs em contexto fraco que codificam para peptídeos pequenos (~25aa). A uORF1 é frequentemente ignorada na varredura ribossomal em condições basais ou de estresse; enquanto a uORF2 é normalmente lida em condições basais gerando dissociação completa do ribossomo ao encontro do seu códon de parada e assim reprimindo a leitura da ORF principal a jusante. Na presença de p-eIF2 $\alpha$ , no entanto, a uORF2 é ignorada na varredura ribossomal e assim a leitura do CDS é favorecida (LEE et al., 2009). Um mecanismo possível para explicar o “*ribosome bypass*” foi investigado para outro gene, DDIT3/CHOP, e mostrou que o fraco contexto da uORF repressora do CDS é fundamental para o reconhecimento ineficiente do códon de iniciação na presença de p-eIF2 $\alpha$  (PALAM et al., 2011).

Por fim, as uORFs não necessariamente atuam como ativadoras ou repressoras da ORF principal sob p-eIF2 $\alpha$ . No caso de C/EBP $\beta$ , por exemplo, a presença uORFs em fase com ORF principal permite a tradução de três diferentes isoformas desta proteína, variando em sua porção N-terminal. As formas longas conseguem interagir entre si o que permite a formação de dímeros com função diferente da isoforma curta (CALKHOVEN et al., 2000). A isoforma curta é preferencialmente produzida sob p-eIF2 $\alpha$  induzido por UV e atua como modulador transcricional (DEY et al., 2012).

## 2.2. *Flavivirus*

### 2.2.1. Vírus de importância global

O gênero *Flavivirus* é parte da família *Flaviviridae*, reino *Riboviria*. Há mais de 50 espécies de *Flavivirus* identificadas e, dentre essas, destacam as de importância médica humana de impacto global causadores da: febre do dengue (DENV), febre do Zika (ZIKV), febre amarela (YFV), febre do oeste do Nilo (WNV), encefalite Japonesa (JEV), encefalite de Saint Louis (SLEV), etc.



DENV é considerado amplamente distribuído nas zonas tropicais e subtropicais do globo, sendo as maiores taxas de incidência registradas nas Américas e na Ásia. O mundo registra hoje cerca de 390 milhões/ano de infecções por dengue, sendo 600-700 mil só no Brasil (BHATT et al., 2013, WHO). Já ZIKV tem uma história de dispersão mais recente e uma distribuição mundial mais limitada (LESSLER et al., 2016). Ainda assim, têm sido reportados mais de 20 mil casos/ano no Brasil desde 2017, após o pico de 277 mil notificações em 2016 (DATASUS). Apesar de menos frequentes, suas manifestações congênitas e neurológicas causam grande impacto na saúde pública. A introdução do ZIKV em território nacional em 2015 coincide com um aumento de 34%, em relação ao ano anterior, no número de internações por Síndrome de Guillain-Barré. E, em 2019 foram confirmados mais de 3 mil casos de Síndrome Congênita associada ao Zika (SVS; MS, 2020a, 2020b).

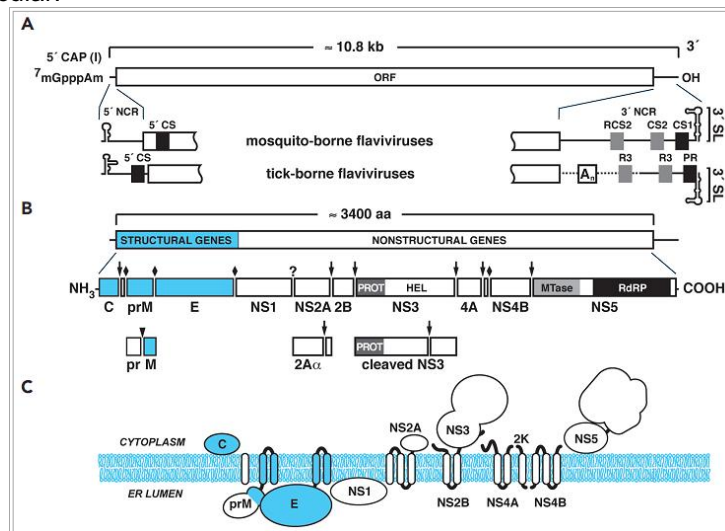
A dificuldade de contenção de DENV, ZIKV e outros está na ampla distribuição de seus vetores, insetos do gênero *Aedes* sp. Custos médicos diretos associados às doenças transmitidas por insetos no Brasil foram estimadas em 400 milhões para o ano de 2016, sendo que dengue corresponde a cerca de 50% deste valor. Já custos indiretos, calculados sobre a perda de produtividade associada a estas doenças, somaram cerca de 430 milhões/ano. É importante salientar que, por falta de dados, esta estimativa não inclui a evolução dos casos de pacientes com síndrome congênita e/ou manifestações neurológicas em decorrência de infecções pelo ZIKV, o que certamente subestima em muito os valores de custos diretos e indiretos desta doença. A soma total dos gastos associados a arboviroses, incluindo o combate ao vetor (R\$ 1,5 bilhão em 2016) é de 3 bilhões/ano (TEICH et al., 2018). Isto corresponde ao maior orçamento dedicado na Américas (SHEPARD et al., 2011).

A ampla distribuição geográfica de diversos flavivírus e o alto impacto financeiro sobre os sistemas de saúde associados a estes urgem o desenvolvimentos de vacinas e drogas efetivas. Uma vacina para DENV (Dengvaxia®, Sanofi Pasteur) foi aprovada em 2015 e autorizada para uso no Brasil em 2016, mas o perfil de segurança do produto ainda é questionado, não sendo recomendado seu uso fora de áreas de alta prevalência (WHO SECRETARIAT, 2017). Não há até o presente, drogas específicas para DENV ou ZIKV, sendo os tratamentos geralmente paliativos sobre os sintomas. O desenvolvimento de novas drogas, portanto, requer uma compreensão maior dos patógenos e das patologias a fim de permitir o desenvolvimento de estratégias antivirais inéditas.

## 2.2.2. Estrutura e replicação viral

Vírus do gênero *Flavivirus* têm em comum morfologia e estrutura genômica. Os vírions são envelopados com cerca de 50 nm de diâmetro. O material genético é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 10-11 kb de comprimento contendo apenas uma ORF flanqueada por dois segmentos não-codificantes 5' e 3'-UTR (CHAMBERS et al., 1990). A poliproteína gerada por essa ORF é posteriormente clivada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais (NS, do inglês “non-structural”) (Figura 2A-B).

**Figura 2 – Organização geral do genoma dos flavivírus e seu transcrito protéico.** A: estrutura e elementos do genoma. B: esquema da poliproteína e produtos de processamento proteolítico. Sítios de clivagem das proteases envolvidas indicadas por: ◆, signalases do hospedeiro; ↓, serino-protease viral; ▼, furina do hospedeiro; ?, proteases desconhecidas. C: A topologia proposta da poliproteína viral e seus produtos de clivagem na membrana reticular.



Fonte: LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007.

A replicação dos *Flavivirus* acontece no citoplasma celular onde promovem convolução de membranas para formação dos complexos replicativos virais. Estas estruturas concentram a maquinaria necessária para o processo replicativo ao mesmo tempo em que protegem o vírus da resposta imune celular (GILLESPIE et al., 2010; REID et al., 2018). Para a replicação faz-se necessária a síntese de proteínas pela leitura direta do genoma viral para então participarem da replicação do genoma em si. Esta requer a síntese de uma fita de RNA complementar, de polaridade negativa, para

servir de molde para síntese de novas fitas positivas (LINDENBACH et al., 2007). A conformação do genoma viral está diretamente relacionada ao seu uso para transcrição (circular) ou tradução (linear) (SANFORD et al., 2019).

A síntese proteica acontece junto ao retículo endoplasmático e a poliproteína resultante se intercala à membrana reticular expondo diferentes porções ao citoplasma e ao lúmen (Figura 2C). Clivagens co- e pós-traducionais individualizam cada uma das 10 proteínas. A montagem das partículas-filhas inicia-se junto à superfície do ER, onde várias cópias da proteína de capsídeo (C) interagem com uma única cópia do RNA genômico viral formando o nucleocapsídeo que brota para o lúmen do ER, de forma a adquirir o envelope lipoproteico contendo as proteínas envelope (E) e membrana (prM/M) em sua superfície. Os vírions resultantes são transportados pelo complexo de Golgi e secretados por vesículas exocíticas. (CHAMBERS et al., 1990; MUKHOPADHYAY et al., 2005; LINDENBACH et al., 2007).

### 2.2.3. Tradução das proteínas virais

O genoma viral dos flavivírus contém um cap do tipo 1 ( $m^7GpppAmG$ ) em sua extremidade 5', mas não contém poliadenilação em sua extremidade 3' e sua única ORF contém contexto fraco (CHAMBERS et al., 1990).

Em sistema *in vitro*, a tradução eficiente do genoma de ZIKV requer a presença do cap 5' e dos fatores de iniciação da tradução celular eIF1, eIF2, eIF3 e do complexo eIF4F (eIF4G, eIF4E e eIF4A) (SANFORD et al., 2019).

No entanto a tradução do genoma dos flavivírus pela via canônica cap-dependente foi questionada por EDGIL et al. (2006) ao verificar tradução eficiente de proteína virais de DENV em células nas quais a proteína ligadora do cap, eIF4E, estava indisponível (por silenciamento gênico ou tratamento com drogas); e também usando repórteres contendo cap 0. Este artigo sugeriu, portanto, a existência de uma via alternativa cap-independente para a tradução viral de mecanismo não conhecido (EDGIL et al., 2006).

Mais recentemente um artigo reportou a existência de função IRES na porção 5'UTR de DENV e ZIKV ao utilizar repórteres bicistrônicos (SONG et al., 2019). Curiosamente ensaios similares com mesma ferramenta refutou a hipóteses de IRES no trabalho anterior (EDGIL et al., 2006). A hipótese de ZIKV conter um IRES semelhante a outros vírus da família *Flaviridae*, como o HCV, também não é

sustentada pelos experimentos *in vitro* supracitados, uma vez que este requer apenas eIF2 and Met-tRNA<sup>Met</sup> em tal sistema. Condição sob a qual ZIKV 5' UTR se mostrou incapaz de iniciar tradução eficiente (SANFORD et al., 2019).

Resta, portanto, confirmar a capacidade dos flavivírus em promover tradução cap-independente e, uma vez confirmada, identificar o mecanismo e compreender o contexto em que esta aconteceria.

### 2.3. Resposta autônoma ao estresse na imunidade antiviral

Ao longo dos anos de coevolução de parasitas e hospedeiros diversas estratégias foram desenvolvidas por ambos os lados para suplantar um ao outro em uma analogia biológica de uma corrida armamentista (tema revisado por DAUGHERTY; MALIK, 2012). Neste contexto, as células desenvolveram a capacidade de reconhecer a presença de vírus em seu interior e montar uma resposta protetora. Ao conjunto de vias que participam dessa atividade dá-se o nome de resposta inata celular. Integrantes clássicos desta resposta são os PRRs (*pattern recognition receptors*), receptores específicos capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Uma vez ativados, esses PRRs iniciam diversas vias de sinalização celular internas e externas que têm como um dos pontos comuns a transcrição e expressão de IFN-I ("*type I interferons*"). O IFN-I por sua vez leva à estimulação celular autócrina e parácrina, promovendo a expressão de mais de 300 genes, denominados conjuntamente como ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*), que conferem às células um estado dito antiviral (MURPHY; WEAVER, 2016).

Mas, além dos sensores diretos clássicos e da sinalização por IFN-I, diversas vias de detecção de estresses estruturais ou metabólicos também funcionam como vias indiretas de "*sensing*" de patógenos. Estas vias são eficientemente ativadas por diversos vírus que, na condição de parasitas intracelulares obrigatórios, são também perturbadores e manipuladores inerentes da homeostase celular. Essas vias, portanto, também compõem a resposta inata celular e são capazes de reduzir ou mesmo bloquear a replicação dos vírus e ativar resposta inflamatória (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; CLÁUDIO et al., 2013; MORETTI; BLANDER, 2017). Fazem parte destas: (i) a autofagia, (ii) a resposta a estresse metabólico coordenada por

mTOR, (iii) a resposta integrada ao estresse, (iv) a resposta ao estresse de retículo, (v) o estresse mitocondrial, (vi) a resposta ao dano de DNA e (vii) os grânulos de estresse (MORETTI; BLANDER, 2017).

### 2.3.1. Resposta integrada ao estresse

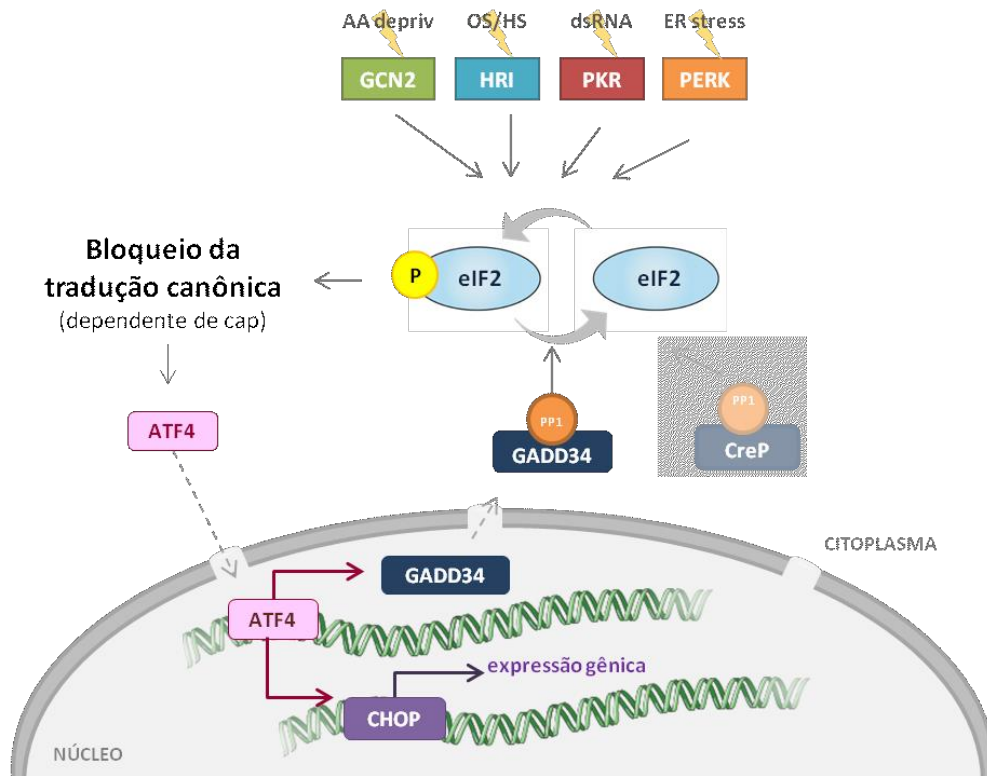
A resposta integrada ao estresse (ISR) é coordenada por quatro quinases, responsáveis pela detecção de diferentes estímulos estressores. São elas:

- HRI (“*heme-regulated inhibitor*”, EIF2AK1), ativada por estresse oxidativo e/ou deficiência de heme;
- PKR (“*protein kinase RNA-activated*”, EIF2AK2), ativada por dsRNA;
- PERK (“*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*”, EIF2AK3), ativada por estresse de retículo; e
- GCN2 (“*general control non-depressible 2*”, EIF2AK4), ativada por privação de aminoácidos (TANIUCHI et al., 2016).

Destas, PERK também participa da resposta ao estresse de retículo. Essas quinases são, portanto, capazes de detectar infecções virais de forma direta (detecção de dsRNA) ou indireta (estresses estruturais ou metabólicos).

O alvo comum dessas quatro quinases é a subunidade  $\alpha$  do fator de iniciação da tradução 2 (eIF2 $\alpha$ ) (S51). A fosforilação de eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) bloqueia a tradução canônica de proteínas, como visto anteriormente, e promove a acumulação de mRNAs e proteínas associadas em grânulos de estresse (SGs) (REINEKE; LLOYD, 2013). A indisponibilidade da maquinaria canônica de síntese proteica promove a tradução de alguns mRNA específicos, que contém uORFs (“*upstream open reading frame*”). Dentre esses, está o ATF4 (“*activating transcription factor 4*”), um fator de transcrição que promove a expressão de genes que ativam vias de resolução do estresse celular, tais como autofagia ou metabolismo redox; ou que ativam vias de morte celular (WEK et al., 2006; BACK et al., 2009; B’CHIR et al., 2013).

**Figura 3** – Esquema da resposta integrada ao estresse



**Fonte:** a autora

A reversão da fosforilação de eIF2 $\alpha$  é feita pela fosfatase PP1 (“*protein phosphatase 1*”) tendo como cofatores CReP (“*constitutive repressor of eIF2 $\alpha$  phosphorylation*”) ou GADD34 (“*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*”, PPP1R15A) que servem como plataformas para associação da enzima e do substrato (JOUSSE et al., 2003; CHOY et al., 2015). A expressão de CReP é constitutiva, já a de GADD34 é induzida. A transcrição desta é majoritariamente regulada por IRF3/7 (DALET et al., 2017) podendo também eventualmente sofrer modulação positiva por CHOP (MARCINIAK et al., 2004). O mRNA de GADD34 por sua vez é preferencialmente traduzido quando há p-eIF2 $\alpha$  pela presença de uma uORF em sua porção 5’UTR (LEE et al., 2009). A expressão de GADD34 funciona então como um *feedback* negativo da ativação da via de ISR que permite à célula retomar seu metabolismo normal após o fim do estímulo (NOVOA et al., 2001). Embora sua expressão, e consequente desfosforilação de eIF2 $\alpha$ , não sejam suficientes para promover o desbloqueio geral da tradução, a expressão de níveis apropriados de algumas citocinas é deficientes em células GADD34<sup>-/-</sup> (CLAVARINO et al., 2012).

No entanto, a ISR também pode gerar sinalização para morte celular. A fosforilação de eIF2 $\alpha$  leva à tradução de ATF4 que promove a expressão de diversos

genes. Dentre eles está o fator de transcrição CHOP (*C/EBP-Homologous Protein*, DDIT3). A via eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP é essencial para indução de autofagia via ISR pois tanto ATF4 quanto CHOP são capazes de induzir a transcrição de diversas proteínas da via autofágica diretamente, por interação com a região promotora, ou indiretamente pela indução de p62 (B'CHIR et al., 2013). Além da indução de autofagia, altos níveis de p-eIF2 $\alpha$  também parecem capaz de modular vias de inflamação, tendo sido reportada capacidade de ativação e inibição NF $\kappa$ B em diferentes modelos (RON & WALTER, 2007).

Tendo implicações sobre autofagia, inflamação e morte é de se esperar uma grande influenciada ISR no curso de infecções virais.

#### 2.3.1.1. PKR

A PKR foi a primeira quinase de eIF2 $\alpha$  identificada e logo caracterizada como uma ISG sensora de dsRNA de pelo menos 30 pb (LEVIN et al., 1980; MEURS et al., 1990). Sua porção N-terminal, contém dois motivos ligadores de dsRNA ("*dsRNA-binding motifs*", dsRBM) e um domínio quinase C-terminal; e apresenta-se frequentemente na forma de dímeros (COLE, 2007). Apesar de ser uma ISG, a PKR é expressa em níveis basais detectáveis. A nível pós-transcricional, conta com um mecanismo de autocontrole traducional, além de fosforilação e interação com outras proteínas (BARBER et al., 1993). Sua via de ativação mais bem descrita acontece pela ligação com dsRNA, que favorece a dimerização e promove alteração conformacional que permite autofosforilação das unidades de PKR (T451) produzindo a forma ativa dessa quinase (ROBERTSON; MATHEWS, 1996).

Tendo dsRNA como seu primeiro ligante identificado há 40 anos, há mais estudos explorando sua participação nas infecções virais do que com as três outras quinases da ISR. Mas, nos últimos anos, diversos estudos demonstraram que a PKR também pode ser ativada por RNAs celulares levando a modulação da montagem do spliceossomo e, conseqüentemente, a regulação da expressão de alguns genes (tema revisado por KAEMPFER et al., 2019). Além disso, PKR também responde a outros ativadores, tais como ISGilação (OKUMURA et al., 2013), fatores de crescimento, citocinas, estímulos pró-inflamatórios e estresse oxidativo (GARCÍA et al., 2007). Outras formas de modulação da atividade da PKR deve-se à interação com PACT e

TRBP, que por sua vez estão diretamente relacionados à maquinaria de miRNA e à modulação de PRRs (LEE et al., 2013; SANCHEZ DAVID et al., 2019).

Diversos trabalhos indicam um “*cross-talk*” entre PKR e IFN para além da promoção da expressão da primeira. Segundo reportado, deleção, silenciamento ou bloqueio da PKR levou a menor produção de IFN-I após a estimulação com poly(I:C) ou infecção com WNV (GILFOY; MASON, 2007). O mecanismo para tal poderia se dar pela indução e estabilização da atividade de NF- $\kappa$ B promovidas pela ativação de IKK levando à fosforilação de I $\kappa$ B e/ou pela indução do bloqueio da tradução que impediria a ressíntese de I $\kappa$ B a A20 (inibidores de NF- $\kappa$ B) (ZAMANIAN-DARYOUSH et al., 2000; CZERKIES et al., 2018). A sustentação da degradação de I $\kappa$ B, pela deleção da PKR, também parece ser a explicação para a indução de NF- $\kappa$ B em algumas linhagens celulares a partir da coestimulação com IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$  via JAK1; ou para o aumento da expressão de Fc $\gamma$ RI/CD64 em monócitos após estimulação com IFN $\gamma$  (DEB et al., 2001; KÅREHED et al., 2007).

Outros trabalhos reportam PKR como regulador negativo da resposta imune celular. Este seria o caso do controle pós-transcricional da expressão de IFN $\gamma$  pela presença de um pseudonó na 5'UTR de seu mRNA. Essa estrutura ativaria PKR, reduzindo a tradução de IFN $\gamma$  e limitando a resposta inflamatória (BEN-ASOULI et al., 2002). Outro mecanismo seria pela atividade de regulador de splicing celular da PKR. Neste caso, a região 3'UTR do pré-mRNA de TNF $\alpha$  contém um ativador de PKR que promove o splicing adequado para a expressão eficiente desta citocina (KAEMPFER et al., 2019).

Por ser um sensor importante na coordenação da resposta imune antiviral, como esperado, diversos vírus, DNA e RNA, dispõem de mecanismos para controlar a PKR. Há relatos na literatura de vírus capazes de promover a degradação da PKR ou de inibir sua ativação por ligação e sequestro da quinase, por inibição de sua dimerização, por síntese de pseudo substratos ou por ativação de fosfatases capazes de desfosforilar tanto a PKR quanto a p-eIF2 $\alpha$  (revisado e resumidos por GARCÍA; MEURS; ESTEBAN, 2007). Dentre os vírus família *Flaviviridae*, a interação direta com a PKR foi reportada com as proteínas NS5A e E2 de HCV e NS2a de JEV. A proteína E2 do HCV contém região homóloga a eIF2 $\alpha$ , funcionando como pseudossustrato para PKR, inibindo sua fosforilação e ativação, contribuindo para a replicação viral ao inibir o bloqueio da tradução. (GALE et al., 1997; TAYLOR et al., 1999). Mecanismo



semelhante parece ser utilizado pela proteína NS2a de JEV (TU et al., 2012). No entanto, em três diferentes estudos de interação proteína-proteína em larga escala não identificaram interação entre PKR e proteínas virais de DENV ou ZIKV (DOOLITTLE; GOMEZ, 2011; KHADKA et al., 2011; SHAH et al., 2018).

### 2.3.1.2. PERK

Diferentemente das demais quinases da ISR, PERK está localizada na membrana do ER. Um estudo recente propôs que a ativação de PERK é dependente da associação de sua porção luminal com CNPY2 ("*canopy homolog 2*") após o deslocamento da ligação de BiP-CNPY2 provocada por estresse de ER (HONG et al., 2017).

PERK também é a única que tem outros alvos de fosforilação identificados, além do eIF2 $\alpha$ : Nrf2, FOXO e diacilglicerol (DAG). Nrf2 ("*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*") na qualidade de fator de transcrição tipo bZIP, quando ativado por fosforilação, promove a transcrição de genes relacionados a homeostase REDOX (CULLINAN et al., 2003). Já a modulação promovida por PERK sobre FOXO ("*forkhead box*"), família de fatores de transcrição associada a homeostase metabólica, pode ser positiva pela fosforilação direta, ou negativa indiretamente via AKT (ZHANG et al., 2013). E, várias formas de DAG, um importante segundo mensageiro celular, podem ser fosforiladas por PERK de forma a modular diversas vias metabólicas, incluindo sinalização por MAPK e AKT e biogênese lipídica (PYTEL et al., 2016). A atividade de PERK normalmente é associada à indução de inflamação e morte celular frente ao estresse de ER (LIN et al., 2009, 2012; LIU et al., 2009; HONG et al., 2017).

Por fim, a atividade de PERK também está relacionada com a modulação de miRNAs e diversas revisões sobre esse tema e suas diferentes implicações em oncogênese e outras doenças estão disponíveis na literatura (HASSLER et al., 2012; PYTEL et al., 2016).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Listagens completas dos anticorpos e demais reagentes usados neste trabalho estão no [Apêndice A](#).

#### 3.1. Linhagens celulares e virais

Células de mamíferos das linhagens A549, VERO ou HEK293 e foram cultivadas a 37°C/5%CO<sub>2</sub> em meio DMEM-F12 suplementado com 1 U/mL de penicilina/estreptomicina e 5% soro fetal bovino, exceto quando especificado. As células da linhagem C6/36 foram cultivadas a 28°C em meio Leibovitz's L-15 suplementado com 1 U/mL de penicilina/estreptomicina e 5% soro fetal bovino. A linhagem celular A549 IFNAR-KO foi gerada pela Dr. Adara Áurea dos Santos, conforme descrito em sua tese de doutorado (SANTOS, 2018).

Vírus DENV-4, cepa TVP-360 (KUCZERA et al., 2016) ou ZIKV, cepa BR 2015/15261 (STROTTMANN et al., 2019) tiveram seus lotes feitos em células C6/36. Todas as titulações deste trabalho foram feita em células VERO e calculadas em unidades formadoras de placa (PFU) ou unidades formadoras de foco (FFU).

#### 3.2. Infecções virais

Todas as infecções virais realizadas neste trabalho seguiram a mesma metodologia geral, com variação do número de células e multiplicidade de infecção (MOI) conforme indicado para cada experimento. As células foram semeadas entre 12 e 24 horas antes da infecção em meio completo (10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup> ou 5x10<sup>5</sup> células/poço para placas de 24, 12 ou 6 poços respectivamente). A MOI foi calculada segundo o número de células semeadas. O inóculo viral foi preparado em meio não suplementado em quantidade suficiente para cobrir a monocamada celular (200, 300 ou 500 µl para placas de 24, 12 ou 6 poços respectivamente). A adsorção viral foi realizada por incubação das células com inóculo por 1h30 sob agitação frequente. Em seguida, as células foram cuidadosamente lavadas uma vez com salina e então incubadas em meio completo (400, 800 ou 1600 µl para placas de 24, 12 ou 6 poços respectivamente). Para titulação e ensaios de placa o meio final de incubação foi mistura 1:1 de meio [2x] e 3,2% CMC (carboximetilcelulose), suplementado com

1 U/mL de penicilina/estreptomicina e 1% soro fetal bovino. A contagem do tempo após a infecção foi sempre feita em relação ao momento de adição do inóculo viral (e não em relação ao fim da adsorção viral).

### 3.3. Produção de linhagens celulares “knockout”

O desenho dos guias foi feito consultando bases de dados online (<https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input> e <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>). As melhores opções para cada gene foram checadas sobre o genoma-alvo (humano), para verificar “off-targets” de forma a selecionar apenas dois pares de guias para cada gene (<http://www.ensembl.org/index.html> e <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). O desenho dos oligonucleotídeos e a clonagem no sistema px459 seguiu o protocolo disponível online pelo laboratório desenvolvedor ([https://media.addgene.org/data/plasmids/62/62988/62988-attachment\\_i-jdFt6Gm-ft.pdf](https://media.addgene.org/data/plasmids/62/62988/62988-attachment_i-jdFt6Gm-ft.pdf)).

Os oligonucleotídeos utilizados para deleção da PKR estão na [Tabela 1](#). Os plasmídeos gerados foram verificados por sequenciamento e então se procedeu à geração dos clones.

**Tabela 1 – Lista oligonucleotídeos para clonagem em sistema px459.** Em vermelho estão os nucleotídeos necessários para a clonagem e que, portanto, não alinham com o genoma.

Gene	Oligo sense	Oligo anti-sense	Exon
PKR <sup>1</sup>	caccgATTATGAACAGTGTGCATCG	aaacCGATGCACACTGTTCATAATc	5
PKR <sup>2</sup>	caccgAAACAGTTCTTCGTTGCTTA	aaacTAAGCAACGAAGAACTGTTTc	8

Linhagens celulares parentais de A549 (WT ou IFNAR<sup>-/-</sup>) foram semeadas em placas de 24 poços a uma confluência de 10<sup>5</sup> células/poço um dia antes da transfecção. A transfecção foi feita com *Lipofectamin 3000* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante: 500 ng de cada plasmídeos por poço. As transfecções foram incubadas por 12-16 horas. Após, as células foram tripsinizadas e contadas para então serem semeadas em 2-3 placas de 96 poços com 500 células/100 µl/poço em meio (mistura 1:1 meio fresco e meio condicionado) contendo 2 µg/ml de puromicina. A seleção em antibiótico aconteceu por quatro dias e então o meio das placas foi trocado para meio (mistura 1:1 meio fresco e meio condicionado) com antibiótico e 20% SFB. Os poços foram observados periodicamente para monitorar o aparecimento

de colônias únicas. Quando as células atingiram aproximadamente 50% de confluência no poço da placa de 96 poços elas foram transferidas para poços em placas de 24 poços. E, quando atingiram pelo menos 80% de confluência, foram testadas.

O teste das placas foi feito por genotipagem por PCR convencional (oligonucleotídeos na [Tabela 2](#)) e/ou por fenotipagem por *imunoblot* (anticorpos listados na [Tabela S5](#), no [Apêndice A](#)).

**Tabela 2 – Lista de oligonucleotídeos para genotipagem dos clones “knockout”.** \*: Tamanho de amplicon esperado para o gene intacto; “pb”: pares de base.

Gene	Primer sense	Primer anti-sense	Amplicon*
PKR <sup>1</sup>	CAACAACGAATTCTTCAGAAGGATT ATCC	AACCTTGCATACAGAATGCTTAAA AGG	245 pb
PKR <sup>2</sup>	AGCGCTTCTGAATCATCATCTGAAG G	CTGGAAGTTATTTTTAAATGAGGA AACGC	171 pb
IFNAR	CGAACATGTAAGTGGTGGGA	CCACTTTCTCCTGGTTGATTTG	290 pb

### 3.4. Transfecção de poly(I:C)

As transfecções de poly(I:C) (“*polyinosinic:polycytidylic acid*”) foram feitas com *Lipofectamin 3000* (Invitrogen). Para cada 10<sup>5</sup> células foram usados: 50 µl de OptiMEM, 1,5 µl de *Lipofectamin3000 reagent*, 1 µl de *P3000 reagent* e 10 µg de poly(I:C). O preparo da mistura dos reagentes seguiu as instruções do fabricante e a mesma foi adicionada sobre 500 ul de meio completo.

### 3.5. Protocolo de marcação com puromicina

O protocolo de marcação de puromicina, usado para observar tradução celular ativa, foi realizado conforme descrito na literatura (SCHMIDT et al., 2009). De forma sucinta, uma hora antes do tempo de recolhimento das células foi adicionada puromicina ao meio de cultivo celular para uma concentração final de 1 µg/ml, seguido por incubação a 37°C/5%CO<sub>2</sub> por 10 minutos (=pulse). Após essa etapa o meio foi removido e as células foram lavadas três vezes com meio completo para então serem incubadas em meio completo fresco por 37°C/5%CO<sub>2</sub> por 50 minutos (=chase).

Recolhimento e/ou fixação das células foi feita segundo a metodologia de análise de escolha.

### 3.6. Imunoblots

Todos os imunoblots seguiram mesma metodologia geral. As amostras foram lisadas em gelo com tampão RIPA plus, que se trata do tampão RIPA (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH8; 1% NP40; 0.1% SDS; 0.5% Sodium deoxycholate) suplementado com os inibidores *cOmplete*<sup>™</sup> e *PhosSTOP*<sup>™</sup> segundo recomendações do fabricante (Roche). Amostras foram resolvidas em SDS-PAGE sob condições desnaturantes e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em TBS (Tris-buffered saline) com 4% de albumina bovina por 30 minutos a temperatura ambiente. Incubações com anticorpos primários para alvos fosforilados foram sempre feitas “overnight” a 4°C; enquanto anticorpos primários para alvos não fosforilados e anticorpos secundários (conjugados com peroxidase) foram sempre feitas por 1 hora à temperatura ambiente. Entre cada uma das etapas listadas houve lavagem em TBS com 0,5% tween 20. A detecção da quimioluminescência foi feita sempre no fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC.

### 3.7. Imunofluorescências

Todas as imunofluorescências realizadas neste trabalho seguiram a mesma metodologia geral. Células foram semeadas a uma confluência de  $10^5$  células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm previamente esterilizadas por autoclavação.

Para a realização de ensaio de placas a infecção foi feita com 20 PFU/poço de forma a permitir a observação de focos de infecção isolados e a incubação por 48h foi feita em meio semissólido.

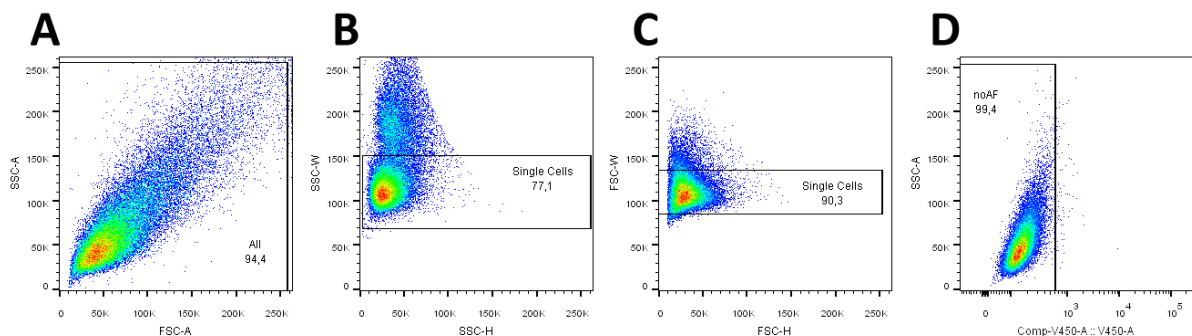
Para recolhimento e marcação, as células foram fixadas com 3% paraformaldeído em PBS (“*phosphate buffered saline*”) por 20 minutos à temperatura ambiente. A permeabilização celular foi feita em solução de 0,5% Triton X-100 em PBS por 4 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a marcação com anticorpos primários e secundários (Tabela S4) diluídos em tampão de bloqueio (2% albumina

bovina em PBS) foi feita por 1 hora a 37°C. Marcação nuclear, quando realizada foi feita com 300 nM de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 5 minutos à temperatura ambiente. Entre cada uma das etapas listadas houve lavagem das lamínulas em PBS. Para selagem da lâmina foi utilizada solução tamponada de álcool polivinílico (25% glicerol; 10% Mowiol® 4-88; 0,1 M tris-HCl, pH 8,5). As micrografias foram realizadas em microscópio confocal Leica DMI6000 B do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

### 3.8. Citometrias de fluxo

Todas as citometrias de fluxo realizadas neste trabalho seguiram a mesma metodologia geral diferindo apenas na etapa de fixação. Para alvos fosforilados as células foram fixadas em BD-Phosflow Lyse/Fix buffer por 10 minutos a 37°C; enquanto alvos não fosforilados foram fixados em 3% paraformaldeído em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. A marcação com anticorpos primários e secundários (Tabela S4) diluídos em tampão de permeabilização (0,1% saponina; 1% soro fetal bovino, em PBS) foi feita por 1 hora a 37°C. Entre cada uma das etapas houve lavagem das amostras em tampão de bloqueio (1% soro fetal bovino em PBS). Para todos os experimentos analisados também foram feitos controles técnicos para ajuste do citômetro: células não marcadas e “*single color*”.

**Figura 4 – Estratégia de “gates” padrão para separação dos eventos válidos na análise de dados de citometria de fluxo.** (A) seleção de todos os eventos não justapostos às margens do gráfico; (B) selecionados eventos únicos por complexidade; (C) selecionados eventos únicos por tamanho; (D) selecionados eventos que não apresentam autofluorescência usando canal aberto. FSC: “forward scatter”; SSC: “side scatter”; A: area; W: “width”; H: “height”.



A aquisição foi feita no citômetro FACSVerse™ (BD) do Laboratório de Imunobiologia da UFSC. A análise dos dados gerados foi feita no software FlowJo

(BD) seguindo o mesmo protocolo inicial de estratégia de “*gates*” para separação dos eventos válidos (Figura 4), seguido pela análise com “*gates*” específicos para as marcações de cada experimento.

### 3.9. Análise de expressão gênica por RT-qPCR

A extração de RNA foi feita com o reagente TRIzol® (Invitrogen). Segundo instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi feita, a partir de 1 ug de RNA total, com enzima M-MLV (LiDI/UFSC) segundo protocolo do lote. Já as qPCRs foram feitas a partir de diluição 1/5 do cDNA usando GoTaq® (Promega) segundo orientações do fabricante, usando o sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems™). Os oligonucleotídeos usados para detecção de cada gene estão na Tabela 3 e para todos foi realizado teste de eficiência.

**Tabela 3** – Lista de oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica por qRT-PCR.

Gene	Primer sense	Primer anti-sense
h18S	TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC	CGC TGA GCC AGT CAG TGT
hIFNL1	TTCCAAGCCCACCACAACACTG	GAGTGACTCTTCCAAGGCGT
hIFNB1	AAACTCATGAGCAGTCTGCA	AGGAGATCTTCAGTTTCGGAGG
hTNFA	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA	CCTCTGATGGCACCACCAG
hISG15	TCCTGGTGAGGAATAACAAGGG	TCAGCCAGAACAGGTCGTC
hDDIT3	GGAGCATCAGTCCCCCACTT	TGTGGGATTGAGGGTCACATC
hGADD34	CTGGCTGGTGGGAAGCAGTAA	TATGGGGGATTGCCAGAGGA
DENV4 vRNA	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG	TCCACCTGAGACTCCTTCCA
ZIKV vRNA	CTGTGGCATGAACCCAATAG	ATCCCATAGAGCACCCTCC

A análise de expressão comparativa foi feita pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando o gene 18s como referência interna.

### 3.10. Ensaios com repórteres de luciferase

Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços semeadas com  $2 \times 10^4$  células/poço e a transfecção de RNA foi feita com o reagente *Lipofectamin 3000* segundo instruções do fabricante.

Para processamento das amostras e reação de detecção de luciferase foi utilizado o *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) segundo instruções

do fabricante. As leituras foram realizadas manualmente na multileitora Infinite M200 (TECAN) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC.

### 3.11. Teste de viabilidade celular por MTT

Células foram semeadas em placas de 96 poço, sendo  $2 \times 10^4$ /poço, entre 12 e 24 horas antes da infecção. A infecção foi feita a uma MOI de 0,01 para ambos os vírus em 100  $\mu$ l/poço por 1h30. Após a retirada do inóculo viral e lavagem, os poços foram incubados com 200  $\mu$ l meio completo. A cada 24 horas houve análise de viabilidade de dois poços por condição. Para tal, o meio dos poços foi retirado e adicionados 100  $\mu$ l/poço de 0,5 mg/ml de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) diluído em meio completo e as células foram incubadas 2 horas (sob condições de cultivo). O meio com MTT foi então removido e os cristais de formazan foram dissolvidos por pipetagem em 100  $\mu$ l/poço de DMSO. A leitura das absorbâncias a 550 e 630 nm foi feita na multileitora Infinite M200 (TECAN) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC. Para o cálculo da porcentagem de viabilidade foi feito o seguinte cálculo:

$$\frac{(v\u00edrus_{abs550} - v\u00edrus_{abs630}) \times 100}{(mock_{abs550} - mock_{abs630})}$$



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Modelo experimental

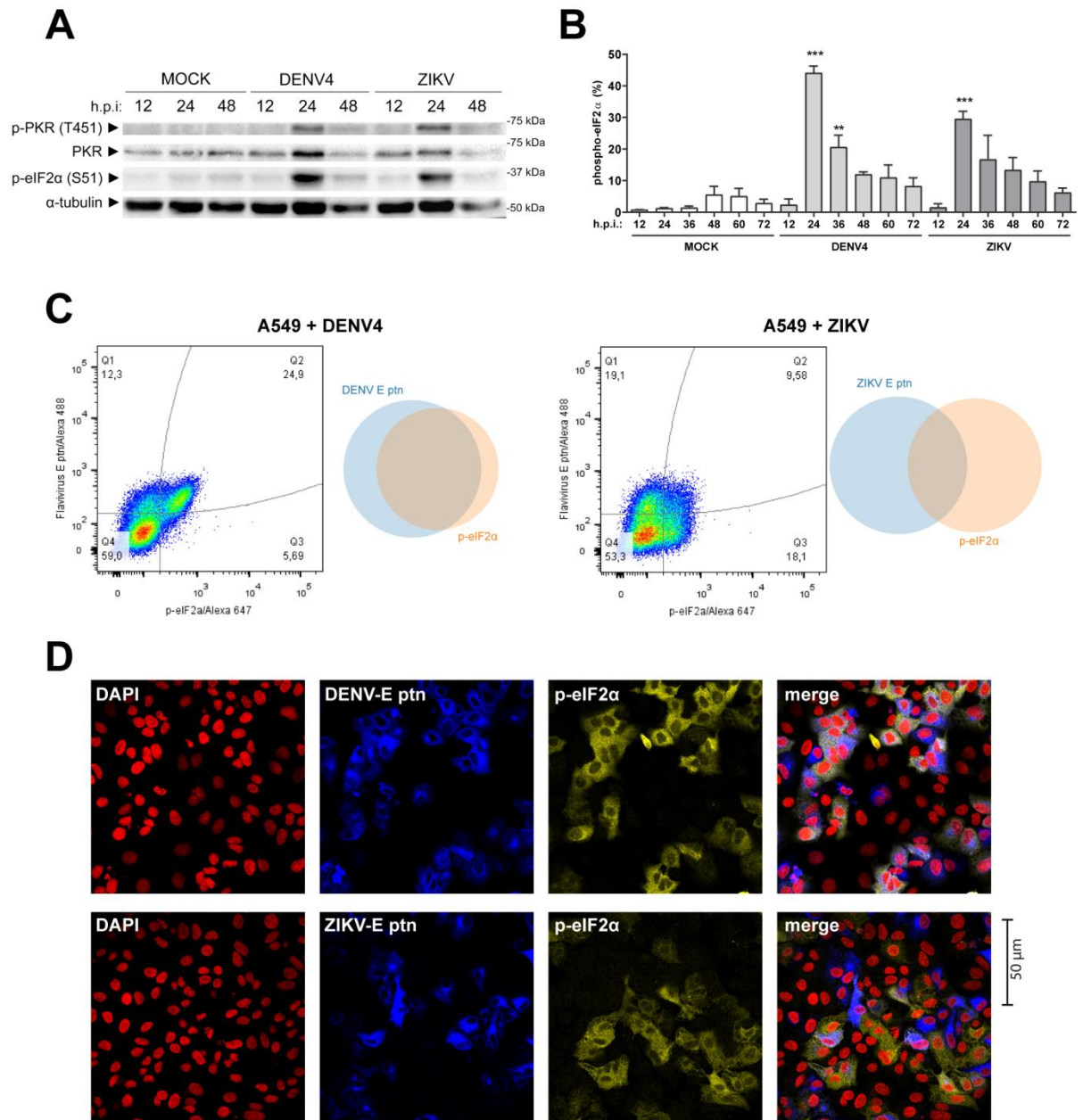
Em nosso modelo são usadas células da linhagem A549 (células epiteliais de carcinoma de pulmão humano) infectadas com DENV4 (cepa TVP360) ou ZIKV (cepa BR 2015/15261). A linhagem A549 apresenta a vantagem de ser imunocompetente, produzindo e respondendo a IFN-I e, até onde se tem caracterizado, também expressa os principais PRRs antivirais. O mesmo não acontece em outras linhagens comumente usadas em estudo de *Flavivirus*, tais como Huh7.5, Vero, BHK-21 e outras. Por outro lado, uma desvantagem da A549 é sua origem tumoral que pode afetar vias de controle celular sobre metabolismo, morte e outros.

A multiplicidade de infecção (MOI) usada para maior parte dos ensaios foi definida de forma a permitir sincronização da infecção. Por isso, foram usadas MOI de 2 e 3 para DENV e ZIKV respectivamente. Para os ensaios de placa/foco faz-se uso de meio semissólido para que o espalhamento da infecção aconteça apenas em células justapostas. Isso permite inferências temporais de eventos com base na localização das células em relação ao centro do foco de infecção. Para esses ensaios, a MOI foi de 0,0001 de forma a permitir a observação dos focos de infecção isoladamente.

### 4.2. Ativação da ISR por DENV e ZIKV

Com o objetivo de verificar a ativação da ISR foi pesquisado o estado de fosforilação da eIF2 $\alpha$  (S51) ao longo da infecção por DENV e ZIKV. Análises por citometria e imunoblot (Figura 5A-B) permitiram detectar pico de p-eIF2 $\alpha$  em 24 hpi, seguido por decaimento significativo em tempos posteriores. A comparação das amostras infectadas com os respectivos controles permite verificar a presença de p-eIF2 $\alpha$  nas células não infectadas em tempos superiores a 48 hpi. Isso possivelmente indica que se trata de estresse causado pela cultura prolongada (meio nutricionalmente pobre, ácido, etc) e não propriamente pelos vírus. O imunoblot também permitiu verificar a ativação da PKR por fosforilação em tempo coincidentes com o p-eIF2 $\alpha$  (Figura 5B).

**Figura 5 – Caracterização da fosforilação da eIF2 $\alpha$  durante a infecção de células A549 por DENV4 ou ZIKV.** Células A549 foram infectadas com DENV4 (MOI 2) ou ZIKV (MOI 3) e recolhidas no tempos indicados para análise. (A) Imagem representativa da análise proteica por imunoblot a partir de gel desnaturante (B) Plotagem da porcentagem de células expressando p-eIF2 $\alpha$ , obtido por citometria de fluxo de dois experimentos independentes. (C) dotplot e diagrama de Venn representativo de três experimentos independentes de análise de co-marcação com anti-proteína E de Flavivirus e anti-p-eIF2 $\alpha$  no tempo de 24 hpi. (D) Imunofluorescência de infecções sob as mesmas condições. No gráfico de colunas, as barras representam as médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi feita por teste *t* não-pareado comparando as amostras infectadas ao respectivo controle não-infectado. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.



O tempo de fosforilação de eIF2 $\alpha$  em relação a infecção é surpreendentemente tardio, considerando que o ciclo de replicação de flavivírus em sistemas *in vitro* é em torno de 6 h e a partir de 10 hpi já há quantidades tituláveis de vírus no sobrenadante sobre essas condições experimentais (dados não mostrados).

Para investigar quais células estariam expressando p-eIF2 $\alpha$  foi usada co-marcação com anticorpo monoclonal direcionado contra a proteína de envelope de flavivírus (Flavi) (Figura 5C-D). As células foram analisadas apenas no tempo de 24 hpi para coincidir com o pico de fosforilação. Na infecção por DENV há uma população duplo-positiva (p-eIF2 $\alpha$ +/Flavi+) significativa, sendo cerca de 60% das células Flavi+ também são p-eIF2 $\alpha$ + e havendo na população p-eIF2 $\alpha$ + apenas ~12% de células Flavi-. Já na infecção por ZIKV há uma menor proporção de células duplo-positivas, havendo assim cerca de 2/3 de Flavi- na população p-eIF2 $\alpha$ + (Figura 5C) Os perfis de co-marcação p-eIF2 $\alpha$ /Flavi em culturas infectadas com cada um dos vírus também pode ser visualizado por imunofluorescência (Figura 5D).

Em resumo, apesar de ambos os vírus promoverem resposta a estresse com o mesmo “*timing*”, as culturas apresentam perfis diferentes. O mais surpreendente é a significativa população de células p-eIF2 $\alpha$ +/Flavi- na cultura infectada com ZIKV. É possível especular que estas células estejam infectadas por ZIKV, mas ainda não expressem quantidade suficiente de proteína de envelope para permitir uma marcação detectável.

Um achado interessante neste bloco de resultados é o diferente perfil dos dois vírus na co-marcação com anti-p-eIF2 $\alpha$  e anti-Flavi E. No entanto, a comparação com a literatura não é possível, pois não foram encontrados trabalhos que fazem uso de uma abordagem similar. A análise de p-eIF2 $\alpha$  é tradicionalmente feita por *imunoblot*, uma técnica de análise em “*bulk*” na qual é perdida a resolução celular que permite a determinação da co-marcação além de uma quantificação acurada (UMAREDDY et al., 2007; PEÑA; HARRIS, 2011; AMORIM et al., 2017; HOU, J. N. et al., 2017; ROTH et al., 2017; LEE et al., 2018). A citometria também permite uma detecção mais sensível de fenótipo pouco frequente na população. Isto fica claro pela comparação entre as Figura 5A e B na qual p-eIF2 $\alpha$  no tempo de 48 hpi é quantificável pela citometria mas quase indetectável pelo *imunoblot*.

#### **4.3. A fosforilação de eIF2 $\alpha$ durante a infecção por DENV/ZIKV é majoritariamente dependente de PKR e independente de IFN-I**

Para investigar a quinase responsável pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  em nosso modelo, foram produzidos por CRISPR-Cas9 linhagens de A549 contendo deleções

gênicas (“*knockout*”). Em virtude da ativação da PKR verificada por imunoblot (vide Figura 5B), iniciou-se a investigação por esta quinase. Foram produzidas então linhagens simples-*knockout* para PKR (PKR<sup>-/-</sup>) ou para o receptor de IFN-I (IFNAR<sup>-/-</sup>, gerada pela Dra. Adara Áurea) ou duplo-*knockout* para ambos os genes (DKO IFNAR<sup>-/-</sup>/PKR<sup>-/-</sup>) (Figura suplementar 1).

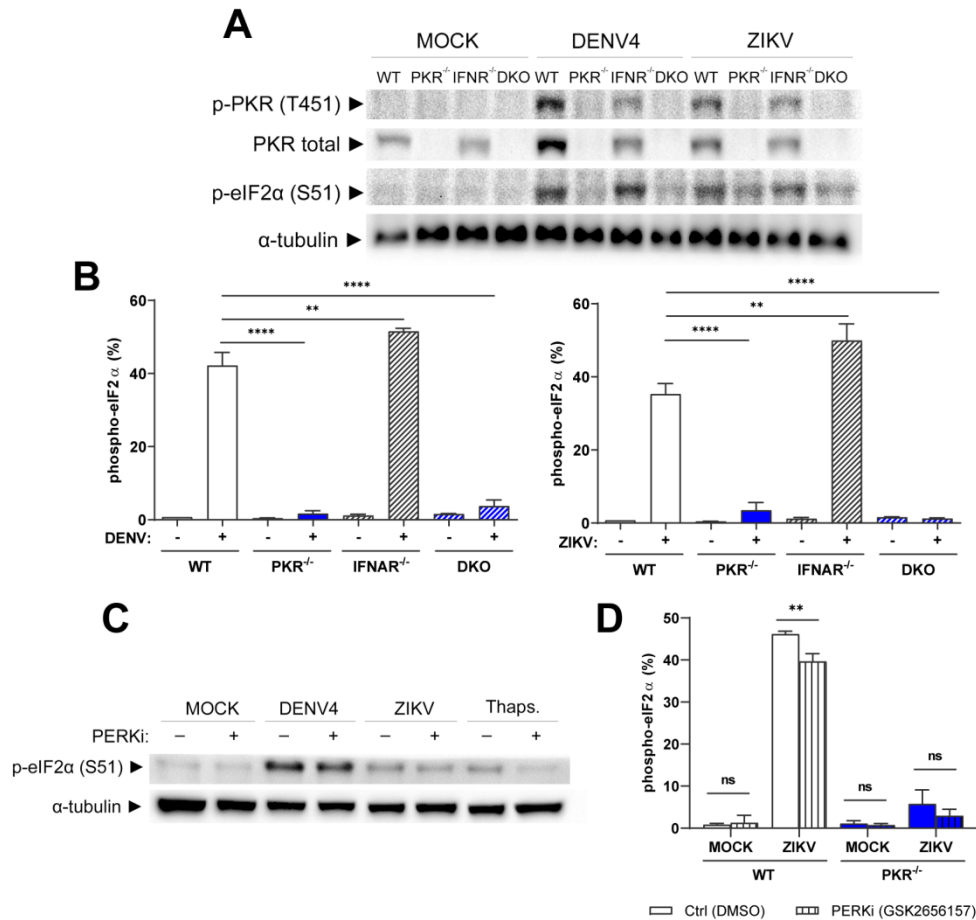
Usando estas linhagens é possível observar por citometria e *imunoblot* que o fenótipo de fosforilação de eIF2 $\alpha$  no tempo de 24 horas após a infecção com ambos os vírus (DENV e ZIKV) é total ou majoritariamente dependente de PKR, uma vez que o mesmo foi perdido na linhagem PKR<sup>-/-</sup> (Figura 6A-B). Sendo PKR um gene estimulado por IFN-I (ISG) e considerando o tempo tardio do fenótipo em relação ao início da infecção foi considerada a participação da sinalização por IFN-I na fosforilação de eIF2 $\alpha$ . O uso da linhagem IFNAR<sup>-/-</sup>, no entanto, refutou esta hipótese ao apresentar o mesmo fenótipo que a linhagem WT e demonstrou que os níveis basais de PKR são suficientes para o fenótipo. Novamente há uma ligeira diferença entre os dois vírus, pois em células infectadas por ZIKV a ausência de sinalização por IFN-I levou a um aumento de p-eIF2 $\alpha$ , enquanto a ausência de PKR e IFNAR levou a abolição de todo p-eIF2 $\alpha$  (Figura 6A-B).

Observando a persistência de uma pequena população p-eIF2 $\alpha$ + na linhagem PKR<sup>-/-</sup> infectada com ZIKV, foi testada a hipótese de participação de PERK na fosforilação de eIF2 $\alpha$  usando o inibidor GSK2656157 (AXTEN et al., 2013). Com o uso da droga é possível observar uma pequena diminuição da fosforilação de eIF2 $\alpha$  na linhagem WT, demonstrando a participação menor desta quinase no fenótipo de estresse em nosso modelo (Figura 6C).

Em resumo, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  durante a infecção por DENV ou ZIKV é total ou majoritariamente dependente de PKR e independente de IFN-I. É importante observar, no entanto, que diferentes modelos celulares podem apresentar fenótipos divergentes do presente, tanto pela ativação de PKR quanto pela fosforilação de eIF2 $\alpha$ .

**Figura 6 – A fosforilação de eIF2 $\alpha$  durante a infecção por DENV/ZIKV é dependente de PKR e independente de IFN-I.** (A) Imagem representativa de análise por imunoblot das linhagens indicadas de A549 infectadas com DENV4 (MOI 2) ou ZIKV (MOI 3) a 24 hpi. Análise estatística e múltiplas comparações por two-way ANOVA. (B) Quantificação por citometria de fluxo da frequência de p-eIF2 $\alpha$  no mesmo ensaio. (C) Imagem representativa de análise por imunoblot das linhagens de A549 WT e PKR<sup>-/-</sup> infectadas com ZIKV (MOI 3) na presença ou ausência do inibidor de PERK (GSK2656157) por 24h. (D) Quantificação por citometria de fluxo da frequência de p-eIF2 $\alpha$  no mesmo ensaio. Análise estatística entre tratadas e não tratadas por teste *t* para amostras não pareadas sem correção. DKO:

duplo “knockout” IFNAR<sup>-/-</sup>/PKR<sup>-/-</sup>. Nos gráficos de colunas, as barras representam as médias ± SEM. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.



Publicações que também fizeram uso de células A549 confirmam nossa observação de p-eIF2α a partir de 18/24 hpi com DENV (UMAREDDY et al., 2007), ZIKV (HOU, S. et al., 2017; ZHOU et al., 2019) ou mesmo com JEV<sup>1</sup> (TU et al., 2012), sendo que três destes trabalhos também reportaram a ativação de PKR. A fosforilação de eIF2α também foi observada após infecção com ZIKV em duas linhagens neuronais humanas (CCF-STTG1 e SK-N-SH) e em modelo de camundongos infectados por via intraperitoneal, embora a ativação das quinases da ISR não tenha sido pesquisada neste trabalho (TAN et al., 2018). Já em células 2fTGH infectadas com DENV, a presença de p-eIF2α é transitória e independente de PKR, GCN2 e PERK (PEÑA; HARRIS, 2011). Estudos com Huh7 são comuns, mas apresentam divergências. Com esta células, um artigo com DENV mostrou p-eIF2α dependente de PERK (LEE et al., 2018). Em um segundo artigo a fosforilação de eIF2α não foi diretamente verificada,

<sup>1</sup> JEV: *Japanese encephalitis virus*, família *Flaviridae*, gênero *Flavivirus*

mas pode ser deduzida pela indução da expressão de genes como *ATF4/DDIT3/TRIB3* concomitante com a infecção (ZANINI et al., 2018). Mas, um terceiro artigo observou total ausência de p-eIF2 $\alpha$  durante infecção por DENV ou ZIKV apesar da ativação de PKR (ROTH et al., 2017). A ausência de p-eIF2 $\alpha$  também é relatada em células Vero (AMORIM et al., 2017).

#### **4.4. PKR não é bloqueada por DENV ou ZIKV, mas apresenta reconhecimento tardio do dsRNA viral**

Dado que o tempo tardio de ativação da PKR durante a infecção não se explica pela necessidade de sinalização por IFN-I, gerou-se a dúvida se a PKR estaria bloqueada pelo vírus em tempos anteriores. Para investigar essa hipótese foi usado poly(I:C), um análogo sintético de dsRNA, para estimular a PKR. A transfecção de poly(I:C) foi feita a 3 hpi e as células foram analisadas em 9 hpi, ou seja, antes da fosforilação provocada pela infecção (Figura 7A).

Os níveis equiparáveis de p-eIF2 $\alpha$  entre as células MOCK e infectadas permitem concluir que a PKR não está bloqueada pelo vírus em tempos precoces da infecção. A ausência de p-eIF2 $\alpha$  nas células PKR<sup>-/-</sup> demonstra que a fosforilação provocada por poly(I:C) é dependente desta quinase (Figura 7B). Sendo assim, não há bloqueio viral da PKR em tempos iniciais da infecção por DENV ou ZIKV. Caso semelhante acontece com a ativação de RIG-I por WNV<sup>2</sup> em A549, onde o vírus não bloqueia a via, mas mostra-se capaz de retardar a ativação deste PRR até tempos superiores a 12 hpi (FREDERICKSEN; GALE, 2006).

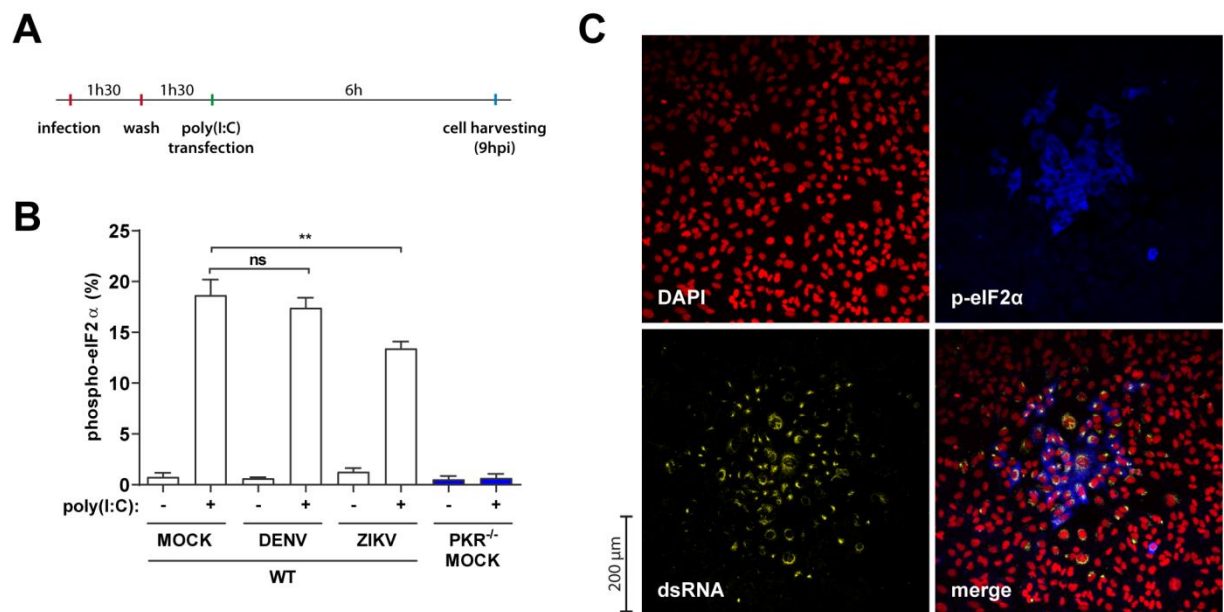
É possível que o dsRNA viral esteja inacessível à PKR. Como citado em seção anterior deste documento, os *Flavivirus* estabelecem complexos replicativos (RC) característicos protegidos por membranas convolutas. Estas estruturas seriam, portanto, eficiente em separar fisicamente o dsRNA viral da PKR, prevenindo a ativação precoce desta quinase. De fato, imunofluorescências de células infectadas em meio semi-sólido e marcadas com anti-p-eIF2 $\alpha$  e anti-dsRNA mostram claramente complexos replicativos de ambos os vírus estabelecidos em células que não têm a via de estresse ativada nos bordos da placa de infecção, demonstrando que a presença

---

<sup>2</sup> WNV: *West Nile virus*, família *Flaviridae*, gênero *Flavivirus*

de RC virais precede temporalmente a marcação com anti-p-eIF2 $\alpha$  (Figura 7C). Este escape efetivo do reconhecimento do dsRNA viral pela PKR, mas se perde em tempos mais avançados de infecção.

**Figura 7 – PKR não é bloqueada por DENV/ZIKV, mas apresenta reconhecimento ineficiente do dsRNA viral.** (A) Esquema do ensaio utilizando poly(I:C) para estimular a ativação de PKR e fosforilação de eIF2 $\alpha$  (B) Quantificação por citometria de p-eIF2 $\alpha$  após estímulo com poly(I:C). (C) Imunofluorescência de focos de infecção de células A549 WT infectadas com DENV4 por 48 horas e meio semi-sólido e marcadas com anti-dsRNA e anti-p-eIF2 $\alpha$ . No gráfico de colunas, as barras representam as médias  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes. Análise estatística foi feita por two-way ANOVA comparando as amostras ao controle não infectado. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.



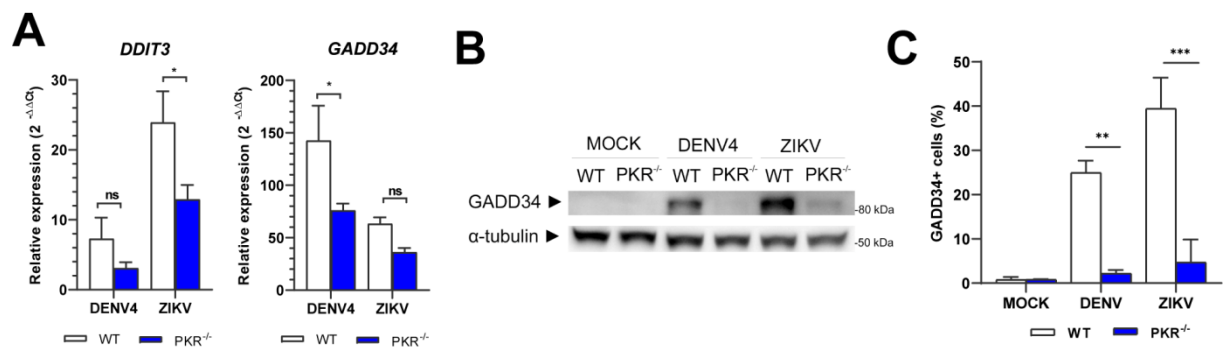
Uma demonstração de que os RC virais são uma forma eficiente de escape da resposta imune celular foi feita em células LLC-PK1 infectadas por JEV. Neste modelo foi demonstrado que dsRNA está majoritariamente contido nos RC até 12 hpi, ocorrendo extravasamento destas estruturas e consequente detecção citoplasmática em tempos superiores (18 e 24 hpi) (ESPADA-MURAO; MORITA, 2011). O mesmo foi observado em ativação da sinalização por IFN-I (ÖVERBY et al., 2010).

<sup>3</sup> TBEV: *Tick-borne encephalitis virus*, família *Flaviridae*, gênero *Flavivirus*

#### 4.5. A deleção de PKR afeta a expressão de genes e proteínas dependentes de eIF2 $\alpha$ durante as infecções por DENV4 e ZIKV

Como anteriormente desenvolvido, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  interrompe a via canônica de tradução celular, mas permite a continuidade da tradução por alguns mecanismos alternativos o que possibilita a expressão de mRNAs específicos. Este é o caso de ATF4, que por sua vez promove a expressão de genes que ativam vias de resolução do estresse celular tais como DDIT3 e GADD34. Sendo assim, avaliou-se a expressão de genes relacionados a esta via por qPCR (Figura 8A) e observou-se uma diferença moderada mas estatisticamente significativa da expressão de ambos os genes entre as linhagens WT e PKR<sup>-/-</sup> durante as infecções com DENV/ZIKV. A transcrição de GADD34 em células PKR<sup>-/-</sup> ainda é alta e bem diferente dos níveis de expressão em MOCK, isso possivelmente se explica por uma via alternativa para sua regulação dependente de IRF3/7 (CLAVARINO et al., 2012; DALET et al., 2017)

**Figura 8 – PKR<sup>-/-</sup> afeta a expressão de genes e proteínas dependentes de eIF2 $\alpha$  durante as infecções.** Células WT e PKR<sup>-/-</sup> infectadas com DENV (MOI 2) ou ZIKV (MOI 3) analisadas a 24 hpi. (A) Quantificação por RT-qPCR da expressão de DDIT3 e GADD34 Expressão relativa calculada por  $\Delta\Delta Ct$  em relação às células WT mock. (B) Análise por imunoblot da expressão proteica de GADD34 e (C) Quantificação por citometria da expressão proteica de GADD34. Resultados de três experimentos independentes. No gráfico de colunas, as barras representam as médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi feita por two-way ANOVA comparando as amostras ao controle não infectado. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.



No entanto, quando a expressão proteica é analisada por imunoblot (Figura 8B) e citometria (Figura 8C) é possível ver uma alteração importante da expressão de GADD34 na linhagem PKR<sup>-/-</sup> infectada. Isso acontece porque a tradução de GADD34 exige p-eIF2 $\alpha$  para suprimir a uORF2, repressora da tradução do CDS (LEE et al., 2009; YOUNG et al., 2015) e demonstra os dois níveis de controle celular sobre a via. A ausência de expressão de GADD34 frente à estimulação com poly(I:C) ou



thapsigargina também foi observada em MEFs incapazes de fosforilar eIF2 $\alpha$  (mutante A/A) (CLAVARINO et al., 2012).

Apesar de não serem exatamente surpreendentes, estes resultados são importantes para mostrar que durante a infecção por ambos os vírus toda a resposta de estresse está ativada, não se restringido somente a PKR e eIF2 $\alpha$ ; e que toda esta resposta foi abolida na linhagem PKR-KO.

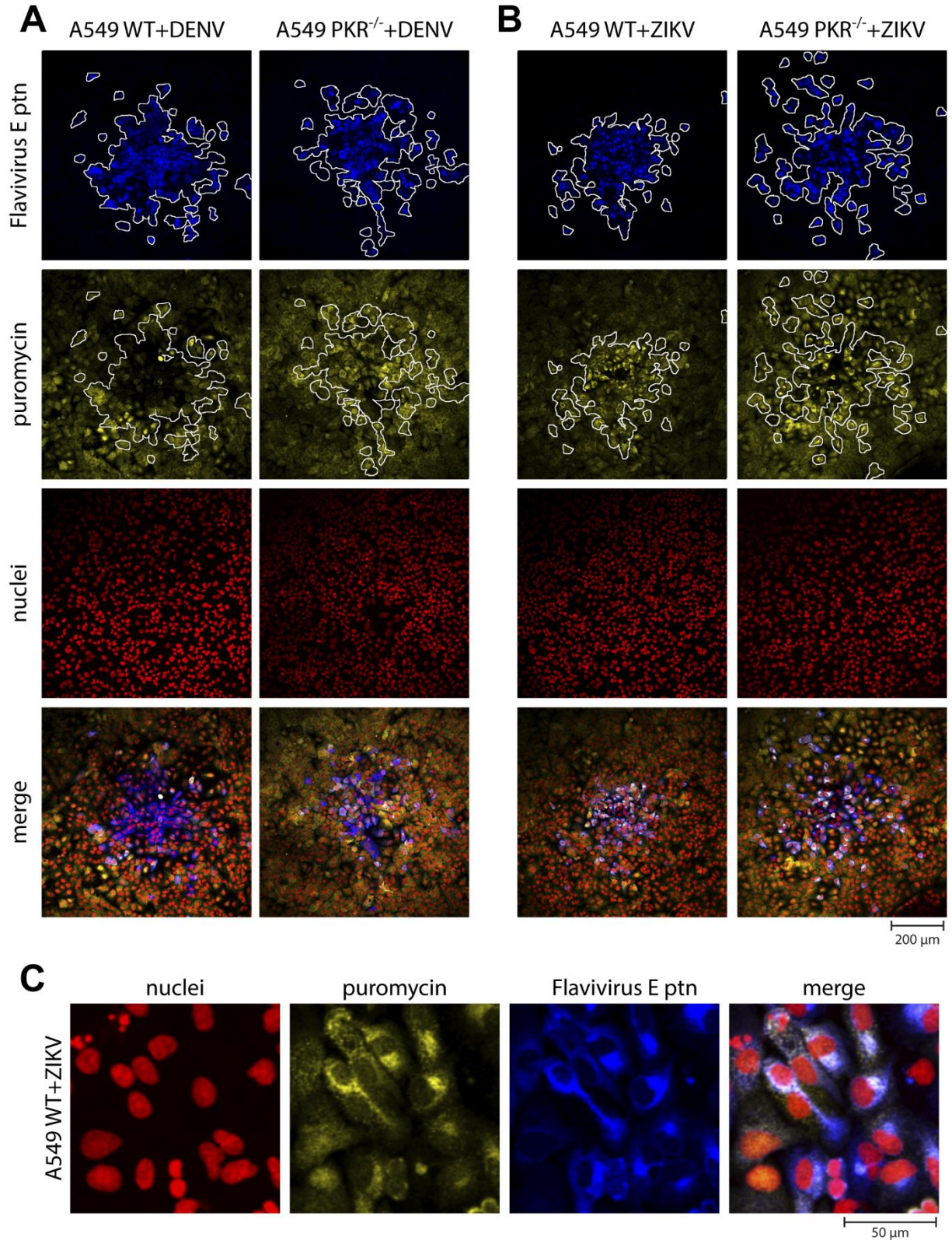
Os resultados também evidenciam os dois níveis de controle celular sobre a via de estresse: transcricional e pós-transcricional. Neste contexto é oportuno destacar que a avaliação da expressão proteica é tão ou mais importante quanto da expressão gênica, uma vez e presença/ausência de p-eIF2 $\alpha$  tem efeito direto na tradução. Sendo assim, diversos trabalhos com modelo de estudo similares que inferem conclusões se baseando apenas em qPCRs devem ser considerados com cautela (e.g. OHRI et al., 2014).

#### **4.6. DENV, mas não ZIKV, promove a parada da tradução em células infectadas**

Para investigar as consequências da fosforilação de eIF2 $\alpha$  sobre a tradução celular durante as infecções virais foi usada metodologia não radioativa. Nesta técnica faz-se uso de adição de baixa concentração de puromicina à cultura uma hora antes do recolhimento das células para análise. Isto permite a incorporação deste antibiótico às cadeias nascentes de proteínas. A visualização de células com tradução ativa acontece pela marcação com anticorpo anti-puromicina (SCHMIDT et al., 2009).

Esta técnica foi usada sobre o modelo de infecção com meio semissólido para observação de placas de infecção isoladas. Desta forma, foi possível observar que a fosforilação de eIF2 $\alpha$  em células infectadas parece ser eficiente em promover o bloqueio da tradução celular na linhagem WT infectada com DENV4, evidenciada pela ausência da incorporação de puromicina no centro da placa viral (Figura 9A). Nas bordas da placa, no entanto, é possível ver uma co-marcação com anti-puromicina e anti-flavivírus evidenciando que há um atraso para esta parada da tradução. Já na linhagem PKR<sup>-/-</sup> não há evidência de regulação negativa da tradução celular, havendo co-marcação com anti-puromicina e anti-flavivírus em toda a placa.

**Figura 9 – Perfil funcional da maquinaria de síntese proteica durante as infecções por DENV e ZIKV.** Imunofluorescência de focos de infecção de células A549 WT e PKR<sup>-/-</sup> infectadas com (A) DENV4 ou (B) ZIKV por 48 horas em meio semissólido, marcadas com anticorpos direcionados para puromicina e proteína de envelope (E) de flavivírus. (C) Zoom sobre células WT infectadas co ZIKV para melhor apreciação do padrão de marcação com ambos anticorpos nestas condições.



Curiosamente, para ZIKV há um perfil contrário, sendo observada maior incorporação de puromicina pelas células WT infectadas do que pelas células PKR<sup>-/-</sup> (Figura 9B). Com um aumento maior, é possível observar que a incorporação de puromicina nas células WT se concentra na região perinuclear, o que coincide com a localização dos complexos replicativos virais (Figura 9C). Este é um indicativo de que nessas células o ZIKV promove um escape da parada da tradução promovida pela fosforilação de eIF2 $\alpha$ . Uma quantificação do sinal para ambos os anticorpos em uma secção transversal das placas virais de DENV/ZIKV pode ser vista na Figura suplementar 2.

ROTH et al. (2017) também observaram a supressão da tradução em células Huh7 infectadas com DENV por 24h utilizando a mesma técnica de marcação com puromicina (não reportado para ZIKV). No entanto, o perfil polissomal de ambos os vírus (assim como para outros flavivírus testados) mostrou a supressão da tradução global da célula em tempos superiores a 12 hpi, sem diminuição da associação do genoma viral a ribossomos ou da síntese proteica viral. Uma diferença importante do modelo usado neste trabalho em relação ao presente é a ausência de p-eIF2 $\alpha$  apesar da presença de p-PKR a 24-36 hpi. Nem a deleção de PKR nem a superexpressão de GADD34 foram capazes de alterar o perfil de bloqueio da tradução celular, demonstrando um possível mecanismo independente de p-eIF2 $\alpha$  neste modelo (ROTH et al., 2017). Desta forma os autores defendem que a supressão da tradução celular observada é independente de p-eIF2 $\alpha$  (ROTH et al., 2017).

Outros mecanismos podem gerar supressão da tradução celular como resposta antiviral. Em resposta a presença de dsRNA, RNase L é capaz de promover parada da tradução geral da célula pela geração regulada de fragmentos de RNA seguidos pela degradação de rRNAs, tRNAs e mRNAs (DONOVAN et al., 2017). Já em resposta a estresse de retículo o sensor IRE1 $\alpha$  da UPR promove clivagem endonucleolítica de mRNAs localizados no ER em um processo denominado RIDD (“*regulated IRE1 dependent decay*”) (HOLLIEN; WEISSMAN, 2006). O IRE1 $\alpha$ , e consequentemente o RIDD, pode ser ativado de forma direta e/ou indireta durante diversas infecções virais.

Sendo assim, não se pode descartar que em outros tempos da infecção por DENV, outras vias de supressão da tradução possam ser ativadas. Mas, haja vista a ausência do mesmo fenótipo nas células PKR<sup>-/-</sup>, pode-se presumir que a parada da

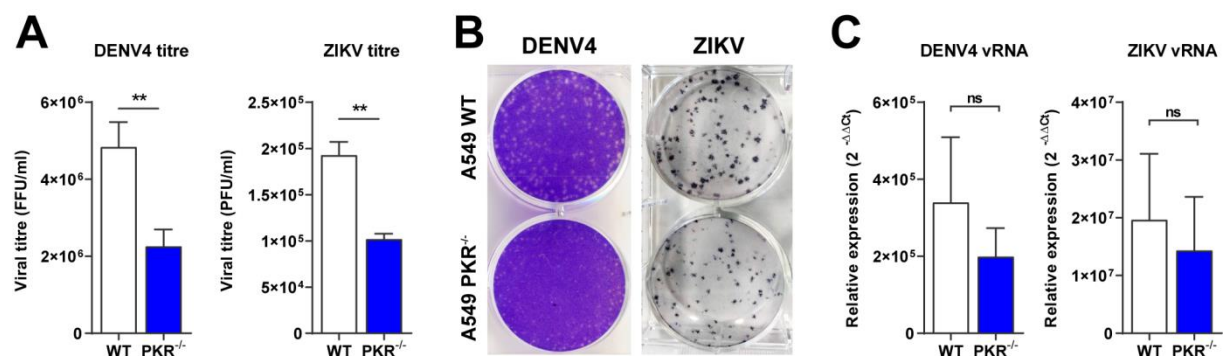
tradução nas condições observadas seja dependente da via PKR-eIF2 $\alpha$ . O mesmo pode ser assumido para o fenótipo oposto de aumento da tradução nas células infectadas por ZIKV.

#### 4.7. A supressão da via PKR-eIF2 $\alpha$ prejudica a replicação de DENV e ZIKV

Uma vez caracterizada a resposta de estresse durante a infecção por DENV/ZIKV, foi investigada a efetividade desta resposta no controle da infecção. Para isso foi comparada a replicação viral nas células WT e PKR<sup>-/-</sup>.

Surpreendentemente, na linhagem PKR<sup>-/-</sup> a replicação viral é menor que na linhagem parental. Embora seja uma diferença limitada (cerca de duas vezes), ela é consistente e evidenciada pelo título viral (Figura 10A) e pelo tamanho das placas de infecção (Figura 10B). Já quando analisada a replicação do genoma viral por qPCR (Figura 10C) a diferença não é clara ou estatisticamente relevante. Estes resultados sugerem que na linhagem PKR<sup>-/-</sup> a replicação viral encontra alguma barreira em alguma fase da replicação viral que não a síntese do genoma.

**Figura 10 – Caracterização da replicação viral em A549 PKR<sup>-/-</sup>.** (A) Titulação de DENV e ZIKV oriundos de infecção de células A549 WT ou PKR<sup>-/-</sup> (amostras recolhidas a 24 hpi). (B) Visualização de placas de lise induzidas por DENV4 e focos de infecção de ZIKV sobre células A549 WT ou PKR<sup>-/-</sup>. (C) Quantificação de RNA viral de DENV e ZIKV oriundos de infecção de células A549 WT ou PKR<sup>-/-</sup> (amostras recolhidas a 24 hpi). PFU: unidades formadoras de placa; FFU: unidades formadoras de focos. No gráfico de colunas, as barras representam as médias  $\pm$  SEM. Análise estatística por teste *t* para amostras pareadas. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.



O menor título viral é particularmente contraintuitivo para o modelo de infecção com DENV uma vez que a via PKR-eIF2 $\alpha$  não somente está ativada (tal como no modelo com ZIKV), mas também mostra-se efetiva em sua controle sobre a tradução

celular. Assim, seria esperado que a disponibilidade da maquinaria de tradução nas células PKR<sup>-/-</sup> permitisse a continuidade da síntese de proteínas virais, gerando, portanto, mais vírus.

Este achado permite a geração de pelo menos duas hipóteses não necessariamente excludentes. A primeira seria de que a deleção da PKR tenha impacto negativo sobre outros braços da resposta antiviral da célula. A segunda seria de um mecanismo de cooptação da ativação da PKR a favor da replicação viral.

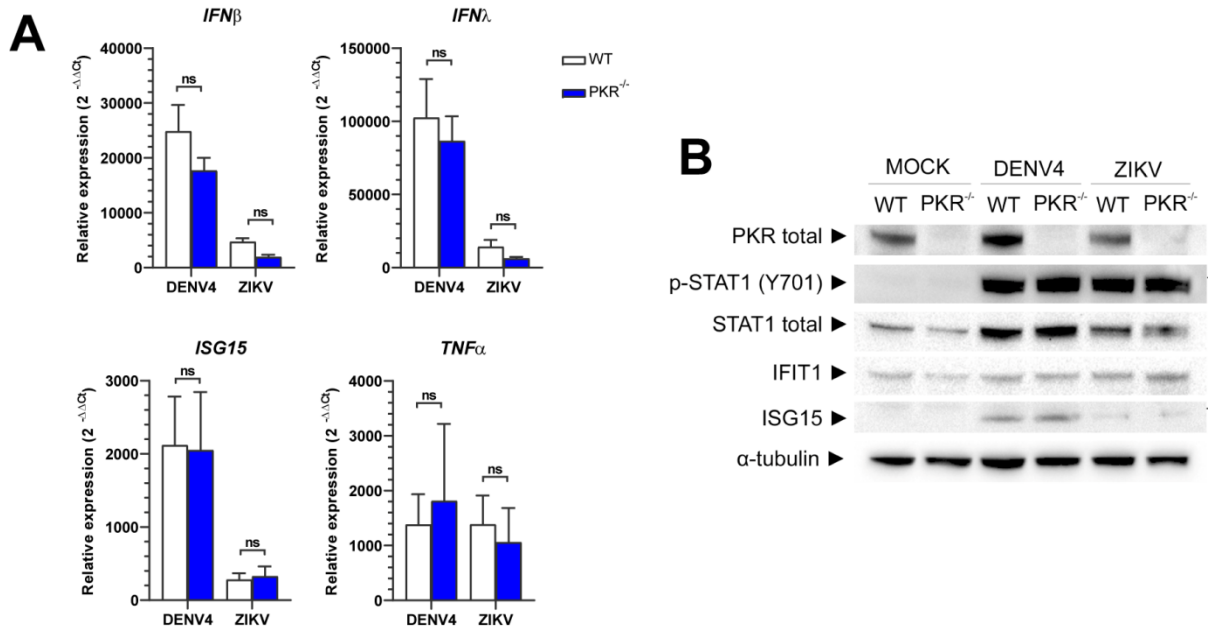
#### 4.8. A deleção de PKR não afeta significativamente a resposta imune inata ou viabilidade celular

O fenótipo de redução da replicação viral na linhagem PKR<sup>-/-</sup> poderia se dar por alterações na resposta imune inata celular, pois, como discutido em seção anterior, diversos trabalhos relatam um “*cross-talk*” entre esta e PKR. Para investigar esta possibilidade foi avaliada a expressão gênica e proteica de elementos desta resposta.

Ao comparar os resultados de qPCR entre as linhagens WT e PKR<sup>-/-</sup> é possível observar que não há diferença significativa na expressão gênica de genes ativados por IRF3/7, IFN-I ou NF-κB (Figura 11A). Mas, apesar da ausência de força estatística é possível observar uma menor da expressão de IFNβ e λ na linhagem PKR<sup>-/-</sup> infectada quando comparada com a parental. A análise de expressão proteica, no entanto, corrobora com a estatística da expressão gênica, pois não há diferença na ativação de STAT1 ou expressão de IFIT1 e ISG15 entre as linhagens, demonstrando a ausência de perturbações na via da sinalização de IFN-I em consequência da deleção de PKR (Figura 11B).

**Figura 11 – Avaliação da resposta imune celular no modelo.** Células WT e PKR<sup>-/-</sup> infectadas com DENV (MOI 2) ou ZIKV (MOI 3) analisadas a 24 hpi. (A) Quantificação por RT-qPCR da expressão de genes da resposta imune *IFNB1*, *IFNL1*, *TNF* e *ISG15*. Expressão relativa calculada por  $\Delta\Delta C_t$  em relação às células WT mock. (B) Análise de expressão e ativação da via de IFN-I por imunoblot (imagem representativa). . No gráfico de colunas, as barras representam as médias  $\pm$  SEM. Análise estatística

por teste *t* para amostras pareadas. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.

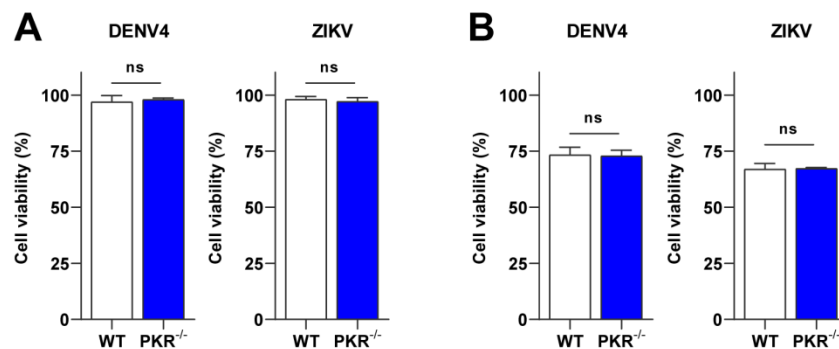


Há, no entanto, uma diferença marcante na resposta entre os vírus, pois ZIKV mostra-se particularmente ineficiente em induzir uma resposta de IFN-I e III quando comparada com DENV4. Isto é notável tanto pela expressão gênica de *IFNB1* e *IFNL* quanto na expressão proteica de STAT1 e ISG15 cujas bandas apresentam-se quase indetectáveis. Achado semelhante foi feito em PBMC e mostrou-se característico do genótipo asiático de ZIKV (COLAVITA et al., 2018). Além disso, a sinalização de IFN-I também é reduzida pela degradação da STAT2 mediada pela proteína viral NS5 (GRANT et al., 2016).

Por fim, a viabilidade celular também foi analisada em 24hpi por citometria (Figura 12A) e MTT (Figura 12B), onde, para ambos os ensaios, a viabilidade de 100% foi estabelecida pelo MOCK. Por citometria foi utilizado reagente capaz de corar células cuja integridade de membrana esteja comprometida. O processo de marcação requer lavagens e centrifugação o que pode levar a perda de células, sobretudo de fragmentos celulares, que não serão contabilizados no resultado final. Já a técnica do MTT mede a viabilidade com base na atividade mitocondrial, cujas desidrogenases reduzem o MTT a cristais de formazan (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998). O princípio desta técnica permite avaliar um estado de toxicidade que precede a morte celular, sendo por isso mais sensível do que a citometria. Ela também envolve menos manipulação celular e seu resultado reflete o número de células viáveis no poço. Desta forma, a viabilidade obtida pelo ensaio do MTT é em geral mais baixa do que a obtida

por citometria. Apesar das diferenças técnicas, ambas mostraram não haver diferença na viabilidade de células WT e PKR<sup>-/-</sup> durante a infecção por ambos os vírus. Resultados complementares de curvas ao longo do tempo com diferentes MOIs estão na [Figura suplementar 3](#).

**Figura 12 – Análise de viabilidade celular no modelo.** Células WT e PKR<sup>-/-</sup> infectadas com DENV (MOI 2) ou ZIKV (MOI 3) analisadas a 24 hpi. (A) Análise de viabilidade celular por citometria utilizando corante Zombie-NIR. (B) Análise de viabilidade celular pelo método do MTT. No gráfico de colunas, as barras representam as médias ± SEM. Análise estatística por teste *t* para amostras pareadas. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns/ausência de marcação: sem diferença estatística.



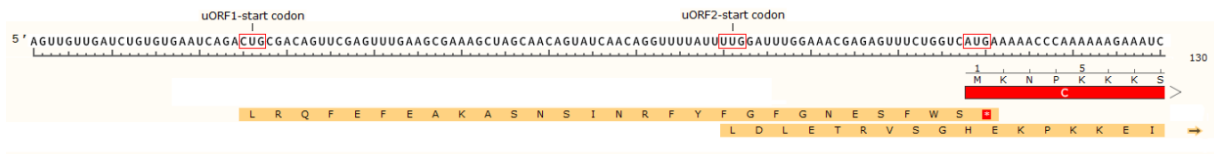
Conjuntamente, os resultados desta sessão permitem concluir que a deleção de PKR não afeta significativamente a resposta imune inata ou sobrevivência celular. Isto exclui, portanto, a possibilidade de alteração destas vias para explicar a menor replicação celular vista na linhagem PKR<sup>-/-</sup>.

#### 4.9. Investigação da leitura de uORFs na extremidade 5' UTR do ZIKV

O próximo passo foi investigar a possibilidade de cooptação da via PKR–eIF2 $\alpha$  a favor da replicação viral. Dada forte a importância de p-eIF2 $\alpha$  para a leitura de uORFs, também foi investigado neste ensaio a atividade de duas uORFs de identificadas no genoma de ZIKV a partir de ensaio de “*ribosome profiling*” (IRIGOYEN et al., 2017). Estas uORFs começam por códons de iniciação alternativos CUG<sub>25</sub> (uORF1) e UUG<sub>80</sub> (uORF2) e não estão na mesma fase de leitura da ORF principal (AUG<sub>108</sub>). O peptídeo codificado pela uORF2 tem uma extensão de 76 aa, tendo seu stop códon localizado 201 nt a jusante à ORF principal ([Figura 13](#)).

**Figura 13 - Localização e fase de leitura das uORFs/ORF de ZIKV.** Sequência da extremidade 5' UTR do genoma do ZIKV com indicação das uORFs 1 e 2 além da ORF principal. As sequências de

aminoácidos correspondentes a cada uORF estão indicadas com realce em laranja, enquanto a sequência da ORF principal está abaixo da sequência nucleotídica. Imagem adaptada da obtida com o software SnapGene (GSL Biotech LLC). “C”: proteína de capsídeo.



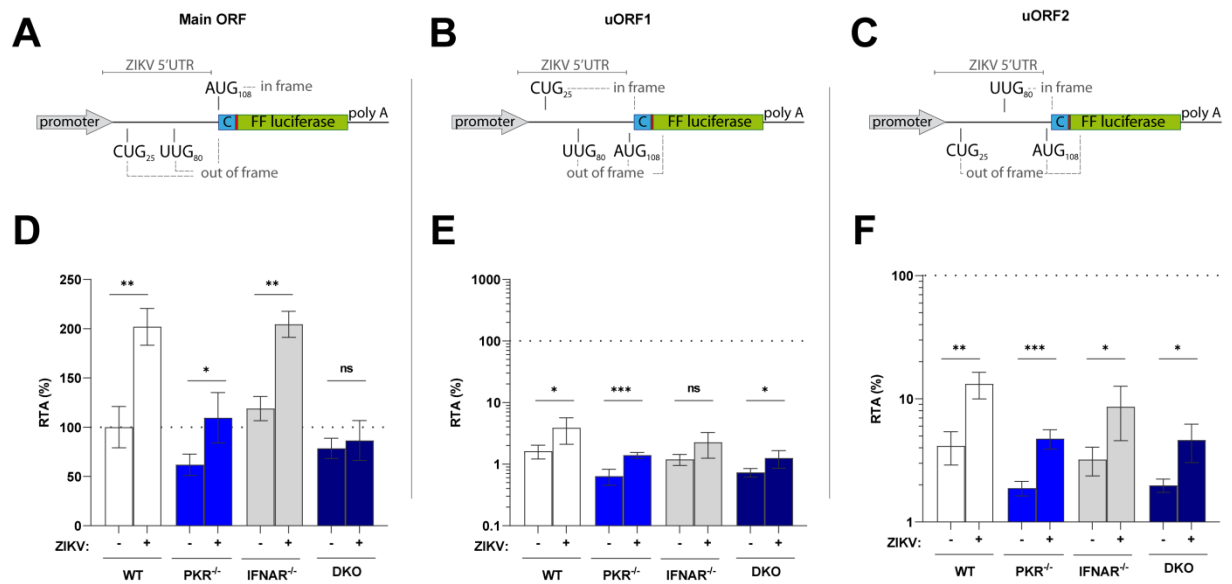
Como método de investigação, optou-se por repórteres luminescentes nos quais a sequência codificante para “firefly” luciferase está em fase com cada códon de iniciação (main ORF/uORF1/uORF2) (Figura 14A-C). Um plasmídeo controle para expressão de *Renilla* luciferase, contendo 5' UTR de  $\beta$  globina (endógeno), foi co-transfectado para normalização dos dados. Todos os plasmídeos utilizados nestes ensaios foram gentilmente cedidos pela Dra. Nerea Irigoyen (University of Cambridge).

O recolhimento das células para análise foi feita 36h após a infecção, sendo 24h após a transfecção dos plasmídeos, de forma a maximizar o tempo de expressão das luciferases sob p-eIF2 $\alpha$ . Para o resultado, é feita a razão do sinal de “firefly” luciferase pelo de *Renilla* luciferase, esta razão permite determinar quantas vezes a 5'UTR viral tem sua leitura favorecida em relação a uma 5'UTR celular. O resultado final é apresentado em Atividade Relativa de Tradução (RTA), dado em porcentagem, para qual a média da razão obtida para as células WT MOCK transfectadas com o plasmídeo “main ORF” é estabelecida como 100%. Assim, é mais fácil visualizar os efeitos de cada condição (linhagens celulares e estimulação) sobre a atividade de tradução da 5'UTR viral.

**Figura 14 - Investigação da leitura de uORFs/ORF na extremidade 5' UTR do ZIKV sob infecção viral.** Esquema de construção dos repórteres de leitura da (A) ORF principal, (B) uORF1 e (C) uORF2. Resultados no ensaio de luciferase das linhagens de A549 indicadas infectadas com ZIKV MOI 3 ou MOCK, transfectadas com os plasmídeos (D) ORF principal, (E) uORF1 e (F) uORF2 a 12 hpi e analisadas a 36 hpi. (C) Resultados normalizados pela expressão de *Renilla* luciferase (plasmídeo cotransfectado) e apresentados em porcentagem em relação a média da razão obtida para as células WT MOCK transfectadas com o plasmídeo “main ORF” (100%). Barras representam a média dos pontos com indicação de SD. Teste *t* para amostras não pareadas. Significância estatística determinada



sem correção. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns: sem diferença estatística. RTA: atividade relativa de tradução

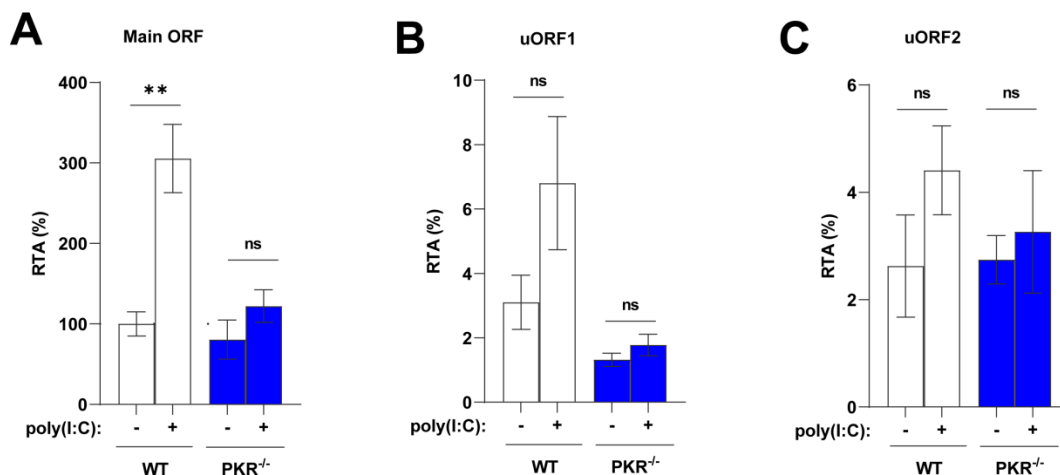


A comparação entre as condições MOCK e infectada para cada linhagem celular permite observar que a infecção viral promove um aumento de aproximadamente duas vezes na leitura da ORF viral principal pelas células WT e IFNAR<sup>-/-</sup>, o que não ocorre com as células PKR<sup>-/-</sup> e DKO (Figura 14D). A infecção da linhagem PKR<sup>-/-</sup> também promove um aumento estatisticamente significativo de tradução, quando comparada com a MOCK. Mas, tanto esta quanto DKO apresentam RTA próximos ou inferiores ao controle (WT MOCK), demonstrando que apresentam menor taxa de leitura da 5'UTR viral. Este resultado demonstra que a 5'UTR de ZIKV é suficiente para promover uma vantagem de tradução relativa do mRNA sob presença de p-eIF2 $\alpha$ . Este achado pode justificar a vantagem de replicação do ZIKV nas células WT em relação às PKR<sup>-/-</sup> (vide Figura 10).

Ambos as uORFs apresentam uma taxa de tradução marcadamente menor do que a ORF principal para toda as linhagens, não chegando a mais do que 20% desta (Figura 14E-F). Este resultado é esperado uma vez que a existência destas ORFs só foi recentemente identificada, necessitando o uso de uma técnica altamente sensível (“*ribosome profiling*”) para tal. O padrão de maior aumento da RTA sob infecção viral também está presente em todas as linhagens para ambas uORFs, o que indica que a presença de p-eIF2 $\alpha$  não é um fator determinante para promoção de sua tradução.

Para confirmar que o fenótipo observado é consequência de p-eIF2 $\alpha$  e não do vírus, foi usado poly(I:C) no lugar de ZIKV. Neste desenho experimental, as células foram primeiramente transfectadas com poly(I:C) (ou somente reagente de transfecção) por 4h e então com os plasmídeos teste e controle por mais 12h. A necessidade de alteração dos tempos de incubação deu-se pela alta toxicidade do poly(I:C).

**Figura 15 - Investigação da leitura de uORFs/ORF na extremidade 5' UTR do ZIKV sob poly(I:C).** Resultados no ensaio de luciferase das linhagens de A549 indicadas transfectadas ou não com poly(I:C) por 4 horas e então transfectadas com os plasmídeos (A) ORF principal, (B) uORF1 e (C) uORF2 por mais 12 h. Resultados normalizados pela expressão de *Renilla* luciferase (plasmídeo cotransfectado) e apresentados em percentagem em relação a média da razão obtida para as células WT MOCK transfectadas com o plasmídeo "main ORF" (100%). Barras representam a média dos pontos com indicação de SD. Teste *t* para amostras não pareadas. Significância estatística determinada sem correção. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; ns: sem diferença estatística. RTA: atividade relativa de tradução



Sob estas condições o fenótipo observado para a ORF principal reproduziu o observado com o vírus (Figura 15A). Este resultado confirma que a fosforilação de eIF2 $\alpha$  é o fator determinante para a vantagem de tradução relativa da 5'UTR viral, e exclui fatores confundidores do resultado anterior, como a possibilidade de outras proteínas virais participarem no fenótipo.

Neste desenho experimental, novamente ambos as uORFs apresentam uma taxa de tradução marcadamente menor do que a ORF principal para toda as linhagens; e novamente uma tendência de aumento da RTA sob poly(I:C), confirmando que a presença de p-eIF2 $\alpha$  não é um fator determinante para promoção da tradução da uORFs (Figura 15B-C).

Em resumo, os resultados acima apresentados indicam que a 5'UTR viral permite o escape da parada de tradução promovida por p-eIF2 $\alpha$ . Esta é uma informação importante que pode indicar uma condição para a tradução alternativa utilizada pelo vírus: a independência do eIF2/TC. Os resultados sobre as uORFs não são claro, e mais estudos são necessário para desvendar as implicações da tradução destas ORFs para a replicação viral.

A vantagem de tradução do genoma viral frente no contexto de p-eIF2 $\alpha$  não é novidade para a família *Flaviviridae*, uma vez que a tradução dos genomas de HCV (gênero *Hepacivirus*) e *Pestivirus C* (anteriormente nomeado CSFV, gênero *Pestivirus C*) também apresentam o mesmo comportamento. Ambos vírus contém IRES em suas 5'UTRs e fazem normalmente uso de eIF2 para iniciação da tradução (RIVAS-ESTILLA et al., 2002; ROBERT et al., 2006; PESTOVA et al., 2008). No entanto, sob ativação de estresse celular, promovem iniciação independente de eIF2, favorecendo a tradução cap-independente (PESTOVA et al., 2008).

Até o presente, este é o primeiro ensaio funcional de atividade das uORFs de ZIKV, mas não o primeiro em *Flavivirus*. Um trabalho anterior tentou detectar por imunoblot e imunofluorescência a expressão do peptídeo codificado por uma uORF previamente identificada no genoma de TBEV (ČERNÝ et al., 2016). O insucesso da detecção deste peptídeo, no entanto, pode ser consequência da baixa sensibilidade das técnicas de detecção escolhidas. Pelos resultados aqui apresentados é possível observar que a expressão das uORFs de ZIKV é cerca de 100 vezes menor do que da ORF principal. O uso de um repórter enzimático como a luciferase, que permite a amplificação de sinal, é uma escolha mais adequada para este contexto.

Uma uORF também foi identificada no genoma de JEV e confirmada com repórter de luciferase. A leitura da uORF também mostrou-se menos eficiente do que da ORF principal (2,7-4 vezes menos). Mas, curiosamente, a uORF foi mais eficientemente lida quando as células foram infectadas, o que não aconteceu com a ORF principal (RIZVI et al., 2020).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Pelo menos dois trabalhos exploraram a possibilidade de uma tradução não canônica pelos flavivírus (EDGIL et al., 2006; SONG et al., 2019) e apesar de discordarem sobre o mecanismo envolvido ambos relataram uma tradução cap-independente eficiente de mRNA contendo a 5'UTR de flavivírus. Se o genoma dos flavivírus contém um cap 5', é possível que uma tradução alternativa seja vantajosa em um contexto específico para ter sido evolutivamente selecionada. Sendo assim, no presente trabalho optamos por focar em entender qual seria este contexto. Para isso foi explorada a ativação da ISR durante a infecção com DENV e ZIKV usando modelo de células de linhagem A549. Com este modelo foi possível observar que ambos os vírus promovem uma fosforilação tardia de eIF2 $\alpha$  majoritariamente dependente de PKR, e independente de IFN-I. Esta fosforilação é capaz de promover a parada tardia da tradução das células infectadas com DENV. De forma oposta, durante a infecção com ZIKV parece haver aumento da tradução celular, apesar de p-eIF2 $\alpha$ , indicando um possível escape viral da resposta celular. Mas, quando avaliado o impacto da deleção de PKR sobre a replicação viral, ambos os vírus apresentaram menores títulos virais e placas de infecção. Já quando avaliado o genoma viral, a diferença entre as linhagens celulares não é tão evidente. A remoção de uma via antiviral ativa durante a infecção resultar em diminuição dos títulos virais é um forte indicativo de um mecanismo de cooptação da ativação da PKR a favor da replicação viral. A análise do perfil de tradução, demonstrou que a 5'UTR do ZIKV é suficiente para promover uma vantagem de leitura da ORF principal durante na presença de p-eIF2 $\alpha$ . Resta ainda entender qual o mecanismo de escape para tradução do genoma sob estresse celular.

A investigação deste mecanismo está em andamento por duas frentes: uORFs e IRES. Embora a atividade das uORFs tenha sido testada neste trabalho (seção 4.9), ainda resta investigar se estas influenciam a leitura da ORF principal. Seguindo a lógica de diversos trabalhos que reportam o controle de uma ORF por uma ou mais uORFs (VATTEM; WEK, 2004; LEE et al., 2009; PALAM et al., 2011 e outros revisados por HARDING et al., 2000; YOUNG; WEK, 2016), estão sendo feitas mutações para inviabilizar cinco uORFs reportadas na 5'UTR de ZIKV: CUG<sub>25</sub> e UUG<sub>80</sub> identificadas por “*ribosome profiling*” (IRIGOYEN et al., 2017); mas também UUG<sub>41</sub>, UUG<sub>86</sub> e CUG<sub>102</sub> identificadas por “*toeprinting*” (SANFORD et al., 2019). As

mutações estão sendo feita sobre o repórter “*main*” (vide figura Figura 14) e serão investigadas da mesma forma feita neste trabalho.

A segunda linha de investigação em andamento é a existência de função IRES na 5' UTR de *Flavivirus*, baseado em relato recente e controverso (SONG et al., 2019). Para tal estão sendo usados repórteres luminescentes bicistrônicos e simples (baseados na sequência de DENV4). Estes são transfectados nas células HEK293 na forma de RNA (transcrição *in vitro*). Os resultados preliminares, no entanto, descartam a existência de IRES na 5'UTR de DENV4, o que concorda com relatos anteriores utilizando sistema de repórteres similar, baseado em DENV2 e testado em linhagem celular BHK (EDGIL et al., 2006). Não se pode descartar que os resultados reportados por SONG et al. (2019) que confirmaram o IRES sejam específicos do modelo usado (vírus modelo, *constructs* e células).

Também não é possível excluir a participação de outras vias no fenótipo de menor replicação de DENV e ZIKV na linhagem PKR<sup>-/-</sup>. Foram testadas e refutadas as hipóteses de que a deleção da PKR alterasse o perfil de sobrevivência celular, ativação de autofagia (dados não mostrados) ou a sinalização de IFN ou NFκB. Mas ainda é possível haver alterações em outras vias não investigadas, como de siRNA, por exemplo.

Como conclusão final, o presente trabalho caracterizou a resposta de estresse em células A549 induzida pela infecção com DENV4 ou ZIKV. Também determinou que a deleção de PKR reduz a replicação viral indicando a cooptação da atividade desta quinase para benefício dos vírus. E por fim, constatou que a 5'UTR de ZIKV permite o escape da parada de tradução promovida por p-eIF2α, apontando a independência do eIF2/TC como condição para uma tradução alternativa utilizada pelo vírus.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Molecular biology of the cell**. Fifth edit ed. 2007.
- AMORIM, R.; TEMZI, A.; GRIFFIN, B. D.; MOULAND, A. J. Zika virus inhibits eIF2 $\alpha$ -dependent stress granule assembly. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.
- AXTEN, J. M.; ROMERIL, S. P.; SHU, A.; et al. Discovery of GSK2656157: An optimized PERK inhibitor selected for preclinical development. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 10, p. 964–968, 2013.
- B'CHIR, W.; MAURIN, A. C.; CARRARO, V.; et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 16, p. 7683–7699, 2013.
- BACK, S. H.; SCHEUNER, D.; HAN, J.; et al. Translation Attenuation through eIF2 $\alpha$  Phosphorylation Prevents Oxidative Stress and Maintains the Differentiated State in  $\beta$  Cells. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 13–26, 2009. Elsevier Ltd.
- BARBER, G. N.; WAMBACH, M.; WONG, M. L.; et al. Translational regulation by the interferon-induced double-stranded-RNA-activated 68-kDa protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 10, p. 4621–4625, 1993.
- BEN-ASOULI, Y.; BANAI, Y.; PEL-OR, Y.; SHIR, A.; KAEMPFER, R. Human interferon- $\gamma$  mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 221–232, 2002.
- BERTRAM, G.; INNES, S.; MINELLA, O.; RICHARDSON, J. P.; STANSFIELD, I. Endless possibilities: Translation termination and stop codon recognition. **Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 255–269, 2001.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013. Nature Publishing Group.
- CALKHOVEN, C. F.; MULLER, C.; LEUTZ, A. Translational control of C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  isoform expression. **Genes and Development**, v. 14, n. 15, p. 1920–1932, 2000.
- ČERNÝ, J.; SELINGER, M.; PALUS, M.; et al. Expression of a second open reading frame present in the genome of tick-borne encephalitis virus strain Neudoerfl is not detectable in infected cells. **Virus Genes**, v. 52, n. 3, p. 309–316, 2016.
- CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, Expression and replication. **Annual Reviews Microbiology**, v. 44, p. 649–88, 1990.
- CHOY, M. S.; YUSOFF, P.; LEE, I. C.; et al. Structural and Functional Analysis of the GADD34: PP1 eIF2 $\alpha$  Phosphatase. **Cell Reports**, v. 11, n. 12, p. 1885–1891, 2015.
- CLÁUDIO, N.; DALET, A.; GATTI, E.; PIERRE, P. Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. **EMBO Journal**, v. 32, n. 9, p. 1214–1224, 2013.
- CLAVARINO, G.; CLÁUDIO, N.; COUDERC, T.; et al. Induction of GADD34 is necessary for dsRNA-dependent interferon- $\beta$  production and participates in the control

of Chikungunya virus infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.

COLAVITA, F.; BORDONI, V.; CAGLIOTI, C.; et al. ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I , II , and III IFN Response in Human PBMC. **Mediators of Inflammation**, 2018.

COLE, J. L. Activation of PKR: an open and shut case? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 57–62, 2007.

COOTS, R. A.; LIU, X. M.; MAO, Y.; et al. m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. **Molecular Cell**, v. 68, n. 3, p. 504- 514.e7, 2017. Elsevier Inc.

CULLINAN, S. B.; ZHANG, D.; HANNINK, M.; et al. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 20, p. 7198–7209, 2003.

CZERKIES, M.; KORWEK, Z.; PRUS, W.; et al. Cell fate in antiviral response arises in the crosstalk of IRF, NF- $\kappa$ B and JAK/STAT pathways. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

DALET, A.; ARGÜELLO, R. J.; COMBES, A.; et al. Protein synthesis inhibition and GADD34 control IFN-  $\beta$  heterogeneous expression in response to dsRNA. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 6, p. 761–782, 2017.

DAUGHERTY, M. D.; MALIK, H. S. Rules of engagement: Molecular insights from host-virus arms races. **Annual Review of Genetics**, v. 46, p. 677–700, 2012.

DEB, A.; HAQUE, S. J.; MOGENSEN, T.; SILVERMAN, R. H.; WILLIAMS, B. R. G. RNA-Dependent Protein Kinase PKR Is Required for Activation of NF- $\kappa$ B by IFN- $\gamma$  in a STAT1-Independent Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 10, p. 6170–6180, 2001.

DEY, S.; SAVANT, S.; TESKE, B. F.; et al. Transcriptional repression of ATF4 gene by CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) differentially regulates integrated stress response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 21936–21949, 2012.

DMITRIEV, S. E.; TEREININ, I. M.; ANDREEV, D. E.; et al. GTP-independent tRNA Delivery to the Ribosomal P-site by a Novel Eukaryotic Translation Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 35, p. 26779–26787, 2010.

DONOVAN, J.; RATH, S.; KOLET-MANDRIKOV, D.; KORENNYKH, A. Rapid RNase L–driven arrest of protein synthesis in the dsRNA response without degradation of translation machinery. **Rna**, v. 23, n. 11, p. 1660–1671, 2017.

DOOLITTLE, J. M.; GOMEZ, S. M. Mapping protein interactions between dengue virus and its human and insect hosts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, 2011.

EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. **Journal of virology**, v. 80, n. 6, p. 2976–2986, 2006.

ESPADA-MURAO, L. A.; MORITA, K. Delayed Cytosolic Exposure of Japanese Encephalitis Virus Double-Stranded RNA Impedes Interferon Activation and Enhances Viral Dissemination in Porcine Cells. **Journal of Virology**, v. 85, n. 13, p. 6736–6749, 2011.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; MAZZON, M.; JACOBS, M.; AMARA, A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009. Elsevier Inc.

- FIJAŁKOWSKA, D.; VERBRUGGEN, S.; NDAH, E.; et al. EIF1 modulates the recognition of suboptimal translation initiation sites and steers gene expression via uORFs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 13, p. 7997–8013, 2017.
- FREDERICKSEN, B. L.; GALE, M. West Nile Virus Evades Activation of Interferon Regulatory Factor 3 through RIG-I-Dependent and -Independent Pathways without Antagonizing Host Defense Signaling. **Journal of Virology**, v. 80, n. 6, p. 2913–2923, 2006.
- GALE, M.; KORTH, M. J.; TANG, N. M.; et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 217–227, 1997.
- GARCÍA, M. A.; MEURS, E. F.; ESTEBAN, M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. **Biochimie**, v. 89, n. 6–7, p. 799–811, 2007.
- GILFOY, F. D.; MASON, P. W. West Nile Virus-Induced Interferon Production Is Mediated by the Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR. **Journal of Virology**, v. 81, n. 20, p. 11148–11158, 2007.
- GILLESPIE, L. K.; HOENEN, A.; MORGAN, G.; MACKENZIE, J. M. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10438–10447, 2010.
- GRANT, A.; PONIA, S. S.; TRIPATHI, S.; et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.
- GUNIŠOVÁ, S.; HRONOVÁ, V.; MOHAMMAD, M. P.; HINNEBUSCH, A. G.; VALÁŠEK, L. S. Please do not recycle! Translation reinitiation in microbes and higher eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 2, p. 165–192, 2018.
- HARDING, H. P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell**, v. 6, n. 5, p. 1099–1108, 2000.
- HASSLER, J.; CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. IRE1, a Double-Edged Sword in Pre-miRNA Slicing and Cell Death. **Developmental Cell**, v. 23, n. 5, p. 921–923, 2012. Elsevier Inc.
- HINNEBUSCH, A. G. Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 3, p. 434–467, 2011.
- HINNEBUSCH, A. G.; IVANOV, I. P.; SONENBERG, N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 352, n. 6292, p. 1413–1416, 2016.
- HOLLIEN, J.; WEISSMAN, J. S. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. **Science**, v. 313, n. 5783, p. 104–107, 2006.
- HONG, F.; LIU, B.; WU, B. X.; et al. CNPY2 is a key initiator of the PERK–CHOP pathway of the unfolded protein response. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 24, n. 10, p. 834–839, 2017.
- HOU, J. N.; CHEN, T. H.; CHIANG, Y. H.; et al. PERK signal-modulated protein translation promotes the survivability of dengue 2 virus-infected mosquito cells and extends viral replication. **Viruses**, v. 9, n. 9, 2017.
- HOU, S.; KUMAR, A.; XU, Z.; et al. Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. (M. S. Diamond, Ed.) **Journal of Virology**, v.



91, n. 16, p. 1–21, 2017.

IRIGOYEN, N.; DINAN, A. M.; MEREDITH, L. W.; et al. The translational landscape of Zika virus during infection of mammalian and insect cells. **bioRxiv**, 2017.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 113–127, 2010. Nature Publishing Group.

JOUSSE, C.; OYADOMARI, S.; NOVOA, I.; et al. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 $\alpha$  phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. **Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 4, p. 767–775, 2003.

KAEMPFER, R.; ILAN, L.; COHEN-CHALAMISH, S.; et al. Control of mRNA splicing by intragenic RNA activators of stress signaling: Potential implications for human disease. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAY, p. 1–6, 2019.

KÅREHED, K.; DIMBERG, A.; DAHL, S.; NILSSON, K.; ÖBERG, F. IFN- $\gamma$ -induced upregulation of Fc $\gamma$ -receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NF $\kappa$ B pathways. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 4, p. 615–624, 2007.

KHADKA, S.; VANGELOFF, A. D.; ZHANG, C.; et al. A physical interaction network of dengue virus and human proteins. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, n. 12, 2011.

KRISHNAMOORTHY, T.; PAVITT, G. D.; ZHANG, F.; DEVER, T. E.; HINNEBUSCH, A. G. Tight Binding of the Phosphorylated  $\alpha$  Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 15, p. 5018–5030, 2001.

KUCZERA, D.; BAVIA, L.; MOSIMANN, A. L. P.; et al. Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2016. Virology Journal.

LEE, A. S. Y.; KRANZUSCH, P. J.; DOUDNA, J. A.; CATE, J. H. D. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 96–99, 2016. Nature Publishing Group.

LEE, H. Y.; ZHOU, K.; SMITH, A. M.; NOLAND, C. L.; DOUDNA, J. A. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 13, p. 6568–6576, 2013.

LEE, Y. R.; KUO, S. H.; LIN, C. Y.; et al. Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018. Springer US.

LEE, Y. Y.; CEVALLOS, R. C.; JAN, E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6661–6673, 2009.

LESSLER, J.; CHAISSON, L. H.; KUCIRKA, L. M.; et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, n. 6300, 2016.

LEVIN, D. H.; PETRYSHYN, R.; LONDON, I. M. Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2) in reticulocyte lysates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 2, p. 832–836, 1980.

- LIN, J. H.; LI, H.; ZHANG, Y.; RON, D.; WALTER, P. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2009.
- LIN, W. C.; CHUANG, Y. C.; CHANG, Y. S.; et al. Endoplasmic reticulum stress stimulates p53 expression through NF- $\kappa$ B activation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, 2007.
- LIU, J.; HUANGFU, W. C.; KUMAR, K. G. S.; et al. Virus-Induced Unfolded Protein Response Attenuates Antiviral Defenses via Phosphorylation-Dependent Degradation of the Type I Interferon Receptor. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 1, p. 72–83, 2009. Elsevier Inc.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- MARCINIAK, S. J.; YUN, C. Y.; OYADOMARI, S.; et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes and Development**, v. 18, n. 24, p. 3066–3077, 2004.
- MEURS, E. F.; CHONG, K.; GALABRU, J.; et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. **Cell**, v. 62, n. 2, p. 379–390, 1990.
- MOHR, I.; SONENBERG, N. Host translation at the nexus of infection and immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 470–483, 2012. Elsevier Inc.
- MORETTI, J.; BLANDER, J. M. Cell-autonomous stress responses in innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 77–86, 2017.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's Immunobiology**. Garland Science, 2016.
- NOVOA, I.; ZENG, H.; HARDING, H. P.; RON, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . **Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 5, p. 1011–1021, 2001.
- OHRI, S. S.; MULLINS, A.; HETMAN, M.; WHITTEMORE, S. R. Inhibition of GADD34, the stress-inducible regulatory subunit of the endoplasmic reticulum stress response, does not enhance functional recovery after spinal cord injury. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.
- OKUMURA, F.; OKUMURA, A. J.; UEMATSU, K.; et al. Activation of double-stranded rna-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2839–2847, 2013.
- ÖVERBY, A. K.; POPOV, V. L.; NIEDRIG, M.; WEBER, F. Tick-Borne Encephalitis Virus Delays Interferon Induction and Hides Its Double-Stranded RNA in Intracellular Membrane Vesicles. **Journal of Virology**, v. 84, n. 17, p. 8470–8483, 2010.
- PALAM, L. R.; BAIRD, T. D.; WEK, R. C. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10939–10949, 2011.
- PEÑA, J.; HARRIS, E. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a

- time-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, p. 14226–14236, 2011.
- PESTOVA, T. V.; BORUKHOV, S. I.; HELLEN, C. U. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 854–859, 1998.
- PESTOVA, T. V.; BREYNE, S. DE; PISAREV, A. V.; ABAEVA, I. S.; HELLEN, C. U. T. eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: A common role of domain II. **EMBO Journal**, v. 27, n. 7, p. 1060–1072, 2008.
- PESTOVA, T. V.; KOLUPAEVA, V. G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. **Genes & development**, v. 3, n. 16, p. 2906–2922, 2002.
- PISAREV, A. V.; SKABKIN, M. A.; PISAREVA, V. P.; et al. The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling. **Molecular Cell**, v. 37, n. 2, p. 196–210, 2010.
- PYTEL, D.; MAJSTEREK, I.; DIEHL, J. A. Tumor progression and the different faces of the PERK kinase. **Oncogene**, v. 35, n. 10, p. 1207–1215, 2016.
- REID, D. W.; CAMPOS, R. K.; CHILD, J. R.; et al. Dengue Virus Selectively Annexes Endoplasmic Reticulum-Associated Translation Machinery as a Strategy for Co-opting Host Cell Protein Synthesis. **Journal of Virology**, v. 92, n. 7, p. e01766-17, 2018.
- REINEKE, L. C.; LLOYD, R. E. Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection. **Virology**, v. 436, n. 2, p. 255–267, 2013. Elsevier.
- RIVAS-ESTILLA, A. M.; SVITKIN, Y.; LOPEZ LASTRA, M.; et al. PKR-Dependent Mechanisms of Gene Expression from a Subgenomic Hepatitis C Virus Clone. **Journal of Virology**, v. 76, n. 21, p. 10637–10653, 2002.
- RIZVI, V. A.; SARKAR, M.; ROY, R. Translation regulation of Japanese encephalitis virus revealed by ribosome profiling. **bioRxiv**, p. 1–19, 2020.
- ROBERT, F.; KAPP, L. D.; KHAN, S. N.; et al. Initiation of Protein Synthesis by Hepatitis C Virus Is Refractory to Reduced eIF2 · GTP · Met-tRNA i Met Ternary Complex Availability. (S. Schmid, Ed.) **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 11, p. 4632–4644, 2006.
- ROBERTSON, H. D.; MATHEWS, M. B. The regulation of the protein kinase PKR by RNA. **Biochimie**, v. 78, n. 11–12, p. 909–914, 1996.
- ROTH, H.; MAGG, V.; UCH, F.; et al. Flavivirus Infection Uncouples Translation Suppression from Cellular Stress Responses. (M. J. Buchmeier, Ed.) **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2017.
- SANCHEZ DAVID, R. Y.; COMBREDT, C.; NAJBURG, V.; et al. LGP2 binds to PACT to regulate RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. **Science Signaling**, v. 12, n. 601, 2019.
- SANFORD, T. J.; MEARS, H. V.; FAJARDO, T.; LOCKER, N.; SWEENEY, T. R. Circularization of flavivirus genomic RNA inhibits de novo translation initiation. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 18, p. 9789–9802, 2019.
- SANTOS, A. Á. DOS. **Dinâmica de resposta celular ao IFN $\beta$  frente ao espalhamento viral** *International Reviews of Immunology*, 2018. Universidade Federal de Santa Catarina.

- SCHMIDT, E. K.; CLAVARINO, G.; CEPPI, M.; PIERRE, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. **Nature Methods**, v. 6, n. 4, p. 275–277, 2009.
- SHAH, P. S.; LINK, N.; JANG, G. M.; et al. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. **Cell**, v. 175, n. 7, p. 1931–1945.e18, 2018.
- SHATSKY, I. N.; TERENIN, I. M.; SMIRNOVA, V. V.; ANDREEV, D. E. Cap-Independent Translation: What's in a Name? **Trends in Biochemical Sciences**, v. xx, p. 1–14, 2018. Elsevier Ltd.
- SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.
- SKABKIN, M. A.; SKABKINA, O. V.; DHOTE, V.; et al. Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. **Genes & Development**, v. 24, n. 16, p. 1787–1801, 2010.
- SKABKIN, M. A.; SKABKINA, O. V.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. Reinitiation and Other Unconventional Posttermination Events during Eukaryotic Translation. **Molecular Cell**, v. 51, n. 2, p. 249–264, 2013. Elsevier Inc.
- SONG, Y.; MUGAVERO, J.; STAUF, C. B.; WIMMER, E. Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. (T. Shenk, Ed.) **mBio**, v. 10, n. 2, 2019.
- STARCK, S. R.; JIANG, V.; PAVON-ETERNOD, M.; et al. Leucine-tRNA initiates at CUG start codons for protein synthesis and presentation by MHC class I. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1719–1723, 2012.
- STROTTMANN, D. M.; ZANLUCA, C.; MOSIMANN, A. L. P.; et al. Genetic and biological characterization of zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 7, p. 1–11, 2019.
- SVS, S. DE V. EM S.; MS, M. DA S. **Boletim epidemiológico 05**. 2020a.
- SVS, S. DE V. EM S.; MS, M. DA S. **Boletim epidemiológico 44**. 2020b.
- TAN, Z.; ZHANG, W.; SUN, J.; et al. ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2018. Journal of Neuroinflammation.
- TANIUCHI, S.; MIYAKE, M.; TSUGAWA, K.; OYADOMARI, M.; OYADOMARI, S. Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 $\alpha$  kinases. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016. Nature Publishing Group.
- TAYLOR, D. R.; SHI, S. T.; ROMANO, P. R.; BARBER, G. N.; LAI, M. M. C. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. **Science**, v. 285, n. 5424, p. 107–110, 1999.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Brazilian Journal of Health Economics**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2018.
- TERENIN, I. M.; ANDREEV, D. E.; DMITRIEV, S. E.; SHATSKY, I. N. A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 3, p. 1807–1816, 2013.
- TERENIN, I. M.; DMITRIEV, S. E.; ANDREEV, D. E.; SHATSKY, I. N. Eukaryotic

translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 8, p. 836–841, 2008.

TERENIN, I. M.; SMIRNOVA, V. V.; ANDREEV, D. E.; DMITRIEV, S. E.; SHATSKY, I. N. A researcher's guide to the galaxy of IRESs. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 8, p. 1431–1455, 2017. Springer International Publishing.

TU, Y.-C.; YU, C.-Y.; LIANG, J.-J.; et al. Blocking Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase PKR by Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein 2A. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10347–10358, 2012.

UMAREDDY, I.; PLUQUET, O.; WANG, Q. Y.; et al. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. **Virology Journal**, v. 4, p. 1–10, 2007.

VASUDEVAN, D.; NEUMAN, S. D.; YANG, A.; et al. Translational induction of ATF4 during integrated stress response requires noncanonical initiation factors eIF2D and DENR. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4677, 2020. Springer US.

VATTEM, K. M.; WEK, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 31, p. 11269–11274, 2004.

WEK, R. C.; JIANG, H. Y.; ANTHONY, T. G. Coping with stress: EIF2 kinases and translational control. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 1, p. 7–11, 2006.

WHO SECRETARIAT. Updated Questions and Answers related to the dengue vaccine Dengvaxia® and its use. **WHO**, , n. December 2017, 2017. Disponível em: <[https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/QA\\_dengue\\_vaccine\\_22Dec2017.pdf?ua=1](https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/QA_dengue_vaccine_22Dec2017.pdf?ua=1)>. .

YOUNG, S. K.; WEK, R. C. Upstream open reading frames differentially regulate genespecific translation in the integrated stress response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 33, p. 16927–16935, 2016.

YOUNG, S. K.; WILLY, J. A.; WU, C.; SACHS, M. S.; WEK, R. C. Ribosome reinitiation directs gene-specific translation and regulates the integrated stress response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 47, p. 28257–28271, 2015.

ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; MOGENSEN, T. H.; DIDONATO, J. A.; WILLIAMS, B. R. G. NF-kappa B Activation by Double-Stranded-RNA-Activated Protein Kinase (PKR) Is Mediated through NF-kappa B-Inducing Kinase and Ikappa B Kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 4, p. 1278–1290, 2000.

ZANINI, F.; PU, S.-Y.; BEKERMAN, E.; EINAV, S.; QUAKE, S. R. Single-cell transcriptional dynamics of flavivirus infection. **eLife**, v. 7, p. 203331, 2018.

ZHANG, W.; HIETAKANGAS, V.; WEE, S.; et al. ER stress potentiates insulin resistance through PERK-mediated FOXO phosphorylation. **Genes and Development**, v. 27, n. 4, p. 441–449, 2013.

ZHOU, S.; YANG, C.; ZHAO, F.; et al. Double-stranded RNA deaminase ADAR1 promotes the Zika virus replication by inhibiting the activation of protein kinase PKR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 48, p. 18168–18180, 2019.

## APÊNDICES

### Apêndice A - Listas de reagentes e materiais usados

**Tabela S4:** Lista de anticorpos usados nesse trabalho.

Produto	Fabricante/Fornecedor	Catalogo	Diluição
PKR Antibody (K-17)	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-707	1:100 (WB)
PKR Antibody (D-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-708	1:100 (WB)
anti-puromycin clone 12D10	Millipore	MABE343	1:20,000 (IF)
Phospho-eIF2 $\alpha$ (Ser51) Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.	9721	1:150 (IF)
GADD34 Antibody	Proteintech	10449-1-AP	1:200 (IF/FACS)
anti-dsRNA MAb J2 (IgG2A)	SCICONS	10010500	
Phospho-eIF2 $\alpha$ (Ser51) (119A11) Rabbit mAb 100 $\mu$ l	Cell Signaling Technology, Inc.	#3597S	1:150 (IF)
Phospho-PKR (Thr451) Polyclonal Antibody	Invitrogen	44-668G	1:100 (WB)
eIF2 $\alpha$ (D-3)	Santa Cruz	133132	1:100 (WB)
Anticorpo monoclonal humano anti- DV	Dra. Federica Sallusto IRB	-	1:100 (IF)
Anti-Flavivirus E protein (4G2)	ICC	-	1:100 (IF)
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.	7076	1:5000 (WB)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.	7074	1:5000 (WB)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Invitrogen	A-21245	1:500 (IF)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11008	1:500 (IF)
Goat anti-Human IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11013	1:500 (IF)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11001	1:500 (IF)
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	Abcam	ab150107	1:500 (IF)

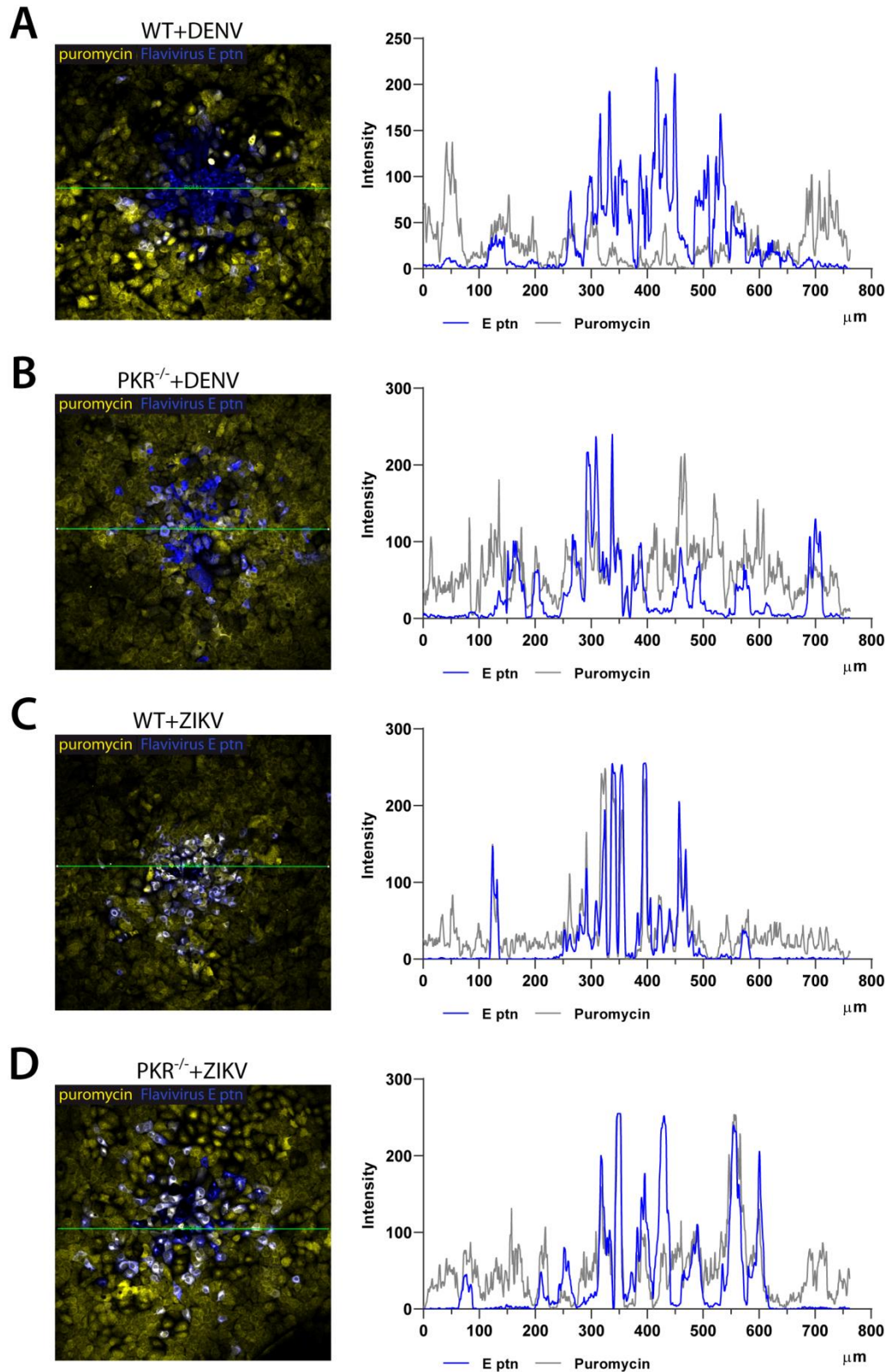
**Tabela S5:** Lista de reagentes usados nesse trabalho.

Produto	Fabricante/Fornecedor	Catalogo
linhagem celular A549	ATCC®	CCL-185™
linhagem celular VERO	ATCC®	CCL-81™
linhagem celular HEK293	ATCC®	CRL-1573™
linhagem celular C6/36	ATCC®	CRL-1660™
Meio DMEM-F12	Gibco™	12500062
Meio Leibovitz's L-15	Gibco™	11415064
Solução penicilina/estreptomicina	Gibco™	15140122
Soro fetal bovino	Gibco™	12657029
Lipofectamin 3000	Thermo Fisher	L3000008
puromicina	Gibco™	A1113802
Opti-MEM™	Gibco™	31985062
IFN $\alpha$ 2a	PBL Assay Science	11100-1
saponina	Dinâmica®	60READIN016788
Zombie NIR™ Fixable Viability Kit	BioLegend	423105
Amersham™ Protran® Western blotting membranes	GE	GE10600002
Mowiol® 4-88	Sigma-Aldrich	81381
DAPI	Invitrogen	D1306
BD-Phosflow Lyse/Fix buffer	BD	558049
CMC sodium salt, medium viscosity	Sigma-Aldrich	C4888
TRIzol® Reagent	Invitrogen™	15596018
GoTaq®	Promega	M3001
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11697498001
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche	4906845001
Poly(I :C)	Sigma-Aldrich	P1530
MTT	Amresco	0793





**Figura suplementar 2 - Quantificação de sinal em imunofluorescências.** Imunofluorescência de focos de infecção de células A549 WT e  $PKR^{-/-}$  infectadas com DENV4 ou ZIKV por 48 horas em meio semissólido, marcadas com anticorpos direcionados para puromicina e proteína de envelope (E) de flavivirus. A região quantificada está morcada pela linha em verde nas micrografias (esquerda) e a respectiva plotagem está em intensidade de cada fluorescência por comprimento ( $\mu\text{m}$ ). Quantificação feita com o software LAS X (Leica Microsystems).



**Figura suplementar 3 - Estudos de viabilidade celular durante as infecções por DENV4 ou ZIKV.** Linhagens de células A549 infectadas com DENV4 ou ZIKV segundo MOI indicado. (A) Análise de viabilidade celular por citometria utilizando corante Zombie-NIR. (B e C) Análise de viabilidade celular pelo método do MTT. No gráfico de colunas, as barras representam as médias  $\pm$  SEM.

