



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

Daniel de Oliveira Patricio

**DNA-PKcs inibe a infecção por *Zika virus* e potencializa a expressão de genes da
resposta antiviral**

Florianópolis

2021

Daniel de Oliveira Patricio

DNA-PKcs inibe a infecção por *Zika virus* e potencializa a expressão de genes da resposta antiviral

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

Patricio, Daniel

DNA-PKcs inibe a infecção por Zika virus e potencializa a expressão de genes da resposta antiviral / Daniel Patricio ; orientador, Daniel Mansur, 2021.

77 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. DNA-PK. 3. IFN-I. 4. IFN-III. 5. Zika virus. I. Mansur, Daniel. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Daniel de Oliveira Patricio

DNA-PKcs inibe a infecção por *Zika virus* e potencializa a expressão de genes da resposta antiviral

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

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Universidade de São Paulo (USP), Brasil

Prof. Dr. André Báfica

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil

Dr. Gabriel M. F. Almeida

Universidade de Jyväskylä, Finlândia

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur

Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus amigos e aos meus colegas de laboratório, principalmente aos meus pais e familiares pelo total apoio, desde minha iniciação na vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, Prof. Dr. André Báfica, Dr. Gabriel M. F. Almeida, Prof. Dr. Fernando Spiller e Prof. Dr. Aguinaldo Pinto por aceitarem avaliar a minha tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. Daniel Mansur, pela orientação de quase 10 anos. Agradeço por acreditar em meu potencial e por todo o investimento na minha formação e no meu desenvolvimento como cientista. Agradeço pelos ensinamentos técnicos e pessoais, por me influenciar com a sua paixão pela ciência e pela forma honesta de trabalhar. Agradeço também pelo apoio em momentos difíceis que passei durante o período de doutorado.

Ao Prof. Dr. André Báfica, por todos os conselhos e críticas durante esses 10 anos de laboratório, que influenciaram demais o desenvolvimento do meu pensamento crítico, científico e profissional, durante todas as conversas filosóficas tomando café, cachaça, ou durante a apresentação de seminários.

Ao Dr. Daniel Mendes, pela contribuição e pelos conselhos na elaboração escrita dessa tese de doutorado.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. André Báfica, Prof. Dr. Juliano Ferreira e Prof. Dr. Daniel Fernandes pela avaliação e contribuição feita no trabalho.

À Dra. Greicy Malaquias pela colaboração e suporte técnico e científico, os quais permitiram o desenvolvimento do trabalho de forma mais eficiente.

Ao Dr. Brian Ferguson, colaborador da Universidade de Cambridge, Inglaterra, que gentilmente nos enviou os guias para geração das células deficientes, bem como pelas discussões e ideias relacionadas aos resultados obtidos.

Ao Dr. Edgar Kozlova, pela colaboração na parte de bioinformática, obrigado pela disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho, pela colaboração dos experimentos relacionados ao dano de DNA nuclear, agradeço por gentilmente nos ceder os reagentes necessários para realização desses experimentos, muito importante para o trabalho. Agradeço também pela contribuição na discussão desses resultados.

À Dra. Taíssa Ricciardi, pela colaboração intelectual com ideias e sugestões que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço por me mostrar as ferramentas de animações, as quais me apaixonei e que me dedico diariamente para sempre melhorar a qualidade dos projetos.

À Ms. Lucilene Granella, por ser a única pessoa em que tive a oportunidade de compartilhar meus conhecimentos técnicos e teóricos, foi muito gratificante fazer parte do seu crescimento profissional, o qual foi muito bem aproveitado nas inúmeras vezes em que colaborou com os experimentos realizados nesse trabalho. Agradeço também pela sua confiança e por sempre poder contar com a sua ajuda.

À todas as minhas mentoras de biologia molecular, Dra. Adara Áurea, Dra. Constanza Espada, Dra. Taíssa Ricciardi e Dra. Zamira Guerra por me ensinarem tudo que sei dessa área da biologia e que enriqueceu demais o meu conhecimento. Agradeço por toda a paciência que vocês tiveram durante os ensinamentos e conselhos.

À Dra. Débora Lückemeyer, pela enriquecedora conversa no final de 2019, onde mudou completamente o meu modo de pensar e trabalhar durante a execução de experimentos.

A todos os integrantes e ex-integrantes do laboratório de imunobiologia (LiDI) por tornar esses anos de trabalho mais leves e divertidos. Agradeço pelo apoio, convivência e amizade. Pelos inúmeros *happy hours*, churrascos, idas à praia, entre outros eventos. Agradeço por todos os ensinamentos que contribuíram no meu crescimento científico. Agradeço em especial aos amigos Dr. Lucas Mascarin, Dr. Daniel Mendes, Dra. Cristina Lorenzini e Dr. Murilo Delgado.

À minha família, pelo amor e dedicação incondicional que eu carrego todos os dias e que me ajudaram a estar onde estou hoje. Agradeço por todos os ensinamentos que impactaram os meus valores pessoais.

Aos colegas de departamento, por todo apoio e companheirismo durante a organização dos cursos de inverno, dos *happy hours*, da representação discente, e das inúmeras discussões que também enriqueceram meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por contribuírem na minha formação acadêmica, com discussões científicas durante as disciplinas e durante os SAFEs e UnSAFEs.

À equipe do Lameb pela disponibilização e pelo suporte com equipamentos utilizados em experimentos desse trabalho;

Às agências de fomento, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

“Tururu”

(MASUDA Toshiro, Sadness & Sorrow, 2002)

RESUMO

Durante infecções virais, as células dos vertebrados reconhecem esses patógenos e produzem um arsenal proteico, orquestrado pelos interferons do tipo I (ex: IFN- β) e interferons do tipo III (ex: IFN- λ 1), os quais são responsáveis pela eficiente inibição da replicação viral. O reconhecimento dos vírus ocorre principalmente pela detecção dos seus ácidos nucleicos através de diferentes sensores de RNA e de DNA presentes no citoplasma das células hospedeiras. Durante infecções por vírus de DNA, o complexo DNA-PK, formado pelas proteínas Ku70, Ku80 e DNA-PKcs, é ativado e atua como um dos sensores de DNA, o qual é crítico para indução da expressão dos interferons do tipo I e III. DNA-PK também é capaz de se ligar em ácidos nucleicos de vírus com genoma de RNA, porém poucos estudos exploram o impacto desse complexo durante a infecção por vírus de RNA. Dessa forma, hipotetizamos que o complexo DNA-PK potencializa as respostas antivirais das células durante a infecção por *Zika virus*. Utilizando células da linhagem A549 como modelo *in vitro* de infecção e o *Zika virus* como modelo de vírus com genoma de RNA, foi demonstrado que as células deficientes para DNA-PKcs são mais suscetíveis à infecção. Nesse modelo, a transcrição de IFN- β ocorre de maneira independente de DNA-PKcs. No entanto, foi demonstrado que o aumento da infecção nas células deficientes para DNA-PKcs está associado com uma notável diminuição da transcrição de IFN- λ 1 e de genes estimulados por interferons, os quais atuam no bloqueio da replicação viral. Além disso, foi observado que o mecanismo de ação de DNA-PKcs nesse modelo independe da translocação citoplasma-núcleo dos fatores de transcrição IRF3 e IRF1. Esses resultados revelam um mecanismo de ação alternativo do complexo DNA-PK durante a infecção por *Zika virus*, contribuindo para uma resposta antiviral eficiente.

Palavras-chave: DNA-PK. IFN-I. IFN-III. *Zika virus*.

ABSTRACT

In the course of virus infections, vertebrate cells recognize these pathogens and produce a protein arsenal, orchestrated by type I (e.g., IFN- β) and type III (e.g., IFN- λ 1) interferons, responsible for efficient viral replication inhibition. Viruses are recognized mostly by nucleic acid detection through different RNA and DNA receptors present in the cytoplasm of host cells. During DNA virus infections, the DNA-PK complex (Ku70, Ku80, and DNA-PKcs proteins) is activated and acts as a DNA sensor, crucial for induction of type I and III interferons. DNA-PK can also bind to viral RNA genome, but few studies explore the impact of this complex during RNA virus infections. We hypothesized that DNA-PK potentializes cellular antiviral responses during *Zika virus* infection. Using A549 cell line as an *in vitro* model of infection and Zika virus as an RNA virus model, we showed that DNA-PKcs-deficient cells are more susceptible to infection. In this model, the IFN- β transcription occurs in a DNA-PKcs independent manner. Yet, we showed the increase of infection in deficient cells is related to a notable decrease of IFN- λ 1 and interferon-stimulated genes transcription. It was also observed that DNA-PKcs action mechanism is independent of IRF1 and IRF3 cytoplasm-nucleus translocation. Together, these results suggest an alternative mechanism of action for the DNA-PK during Zika virus infection, assisting to an efficient antiviral response.

Keywords: DNA-PK. IFN-I. IFN-III. *Zika virus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático da produção e ação do interferon por sensores citoplasmáticos	16
Figura 2 –Diferentes alvos dos ISGs (<i>IFN-stimulated genes</i>) no ciclo de replicação viral.....	20
Figura 3 – Estratégias de <i>gates</i> para análise de citometria de Fluxo	30
Figura 4 – Seleção de clones de células A549 deficientes para DNA-PKcs.....	40
Figura 5 – Avaliação da expressão de DNA-PKcs em células A549	41
Figura 6 – Células <i>PRKDC</i> ^{-/-} são mais suscetíveis à infecção por ZIKV.....	42
Figura 7 – DNA-PKcs e ZIKV estão envolvidos no controle de splicing alternativo de SRSF1	44
Figura 8 – Ausência de ligação entre DNA-PKcs e NS5	45
Figura 9 – A atividade de DNA-PKcs durante a infecção por ZIKV ocorre de maneira independente de IFN-I.....	46
Figura 10 – DNA-PKcs regulação da via dos IFN-III durante a infecção por ZIKV.....	47
Figura 11 – A inibição de DNA-PKcs aumenta a infecção por ZIKV e regula a expressão de IFNL1	48
Figura 12 – Atividade de DNA-PKcs independente da translocação nuclear de IRF1, IRF3 e IRF7 durante infecção por ZIKV.....	50
Figura 13 – Atividade de DNA-PKcs independente da translocação nuclear de IRF1 e IRF5 durante infecção por ZIKV.....	52
Figura 14 – Células A549 são resistentes ao estímulo com DNA exógeno	53
Figura 15 – ZIKV não induz dano de DNA em células A549.....	54
Figura 16 – A via dos sensores de RNA é essencial para a expressão de IFN-I e IFN-III durante a infecção por ZIKV	55
Figura 17 – DNA-PKcs induz a expressão de IFN- λ 1 durante a infecção por ZIKV	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Lista dos anticorpos primários para imunofluorescência e suas respectivas diluições	32
Quadro 2 – Condições da reação de RT-PCR	33
Quadro 3 – Iniciadores utilizados na reação de qPCR	34
Quadro 4 – Condições de amplificação na reação de qPCR	34
Quadro 5 – Lista dos anticorpos primários para <i>Western blot</i> e suas respectivas diluições.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
C	Capsídeo
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CARDIF	<i>CARD adaptor inducing IFN-β</i>
cGAMP	<i>cyclic GMP-AMP</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CMC	Carboximetilcelulose
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DBS	<i>Double-strand DNA break</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PK _{cs}	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
dsRNA	RNA de fita dupla
E	Envelope
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HSPA8	<i>Heat shock protein A8</i>
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IFN- λ	Interferon lambda
IFN- ω	Interferon ômega
IFNAR1	<i>Interferon alpha receptor 1</i>
IFNAR2	<i>Interferon alpha receptor 2</i>
IFNLR1	<i>Interferon lambda receptor 1</i>
IKK ϵ	<i>IκB kinase ϵ</i>
IL-10R2	<i>Interleukin-10 receptor 2</i>
IPS-1	<i>Interferon-β promoter stimulator 1</i>
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>
ISD	<i>Interferon-stimulatory DNA</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated gene</i>
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>

MITA	<i>Mediator of IRF3 activation</i>
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NS	Não estrutural
OAS	2'5'-olidoa-A sintetase
PFA	Paraformaldeído
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PIKK	<i>PI 3-kinase related kinase</i>
PKR	<i>Protein kinase R</i>
prM	Precursora de membrana
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Pol III	RNA polimerase III
RNaseL	Endorribonuclease L
rRNA	RNA ribossomal
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SFB	Soro fetal bovino
SRSF1	<i>Serine and arginine rich splicing factor 1</i>
ssRNA	RNA de fita simples
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TA	Temperatura ambiente
TBK1	<i>Tank-binding kinase 1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
TYK2	<i>Tyrosin-protein kinase 2</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VISA	<i>Virus-induced signaling adaptor</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
WT	Tipo selvagem (<i>Wild type</i>)
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	INTERFERON.....	16
1.1.1	Interferons do tipo I	17
1.1.2	Interferons do tipo III	18
1.2	GENES ESTIMULADOS POR IFN.....	19
1.3	VIA DOS SENSORES DE RNA.....	20
1.4	VIA DOS SENSORES DE DNA.....	22
1.5	COMPLEXO DNA-PK.....	24
1.6	ZIKA VIRUS	25
1.7	OBJETIVOS.....	27
1.7.1	Objetivo Geral	27
1.7.2	Objetivos Específicos	27
2	METODOLOGIAS	28
2.1	REAGENTES.....	28
2.2	CÉLULAS.....	28
2.3	VÍRUS.....	28
2.3.1	Preparação de estoque viral	28
2.3.2	Ensaio de placa	29
2.3.3	Infecção viral	29
2.4	CITOMETRIA DE FLUXO.....	30
2.5	VIABILIDADE CELULAR POR MTT	31
2.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	31
2.7	BIOLOGIA MOLECULAR.....	33
2.7.1	RT-qPCR	33
2.7.2	Western blot	35
2.8	ANÁLISE DE SPLICING ALTERNATIVO	36
2.9	CRISPR/CAS9.....	36

2.10	IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	37
2.11	CONCATEMERIZAÇÃO DE DNA	38
2.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
3	RESULTADOS.....	39
3.1	GERAÇÃO DE CÉLULAS DEFICIENTES PARA DNA-PKcs.....	39
3.2	AS CÉLULAS <i>PRKDC</i> -/- SÃO MAIS SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO POR ZIKV	41
3.3	REGULAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO E LIGAÇÃO DE DNA-PKCS EM NS5	43
3.4	DNA-PKCS REGULA A EXPRESSÃO DE INTERFERON LAMBDA 1 DURANTE A INFECÇÃO POR ZIKV	45
3.5	ATIVIDADE DE DNA-PKCS INDEPENDENTE DA VIA DOS SENSORES DE DNA	53
4	DISCUSSÃO.....	56
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

As células do sistema imune são células especializadas na defesa do organismo contra agentes infecciosos invasores. Algumas estratégias de defesa características dessas células, como o reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos, são compartilhados com células não imunes (ex. células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, entre outras). Apesar dos avanços da medicina no combate às doenças infecciosas causadas por vírus, essas doenças de maneira geral continuam sendo o principal problema de saúde pública no mundo, por exemplo os flavivírus, como *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV) e *West Nile virus* (WNV), os quais atualmente não possuem medicamentos acessíveis para o seu tratamento (KAUFMANN et al., 2018).

Os vírus são patógenos intracelulares obrigatórios que utilizam componentes das células hospedeiras para sua replicação. Por outro lado, células infectadas podem ativar mecanismos antivirais em respostas a estas infecções, bloqueando o espalhamento do patógeno para as células adjacentes, além de preparar a montagem de uma resposta adaptativa realizados por linfócitos. O principal mecanismo antiviral das células hospedeiras ocorre através da indução de uma família de citocinas chamadas de *interferon* (IFN) (TEIJARO, 2016). O desenho esquemático na **Figura 1** ilustra as vias de indução e ação dos IFNs, os quais serão detalhados adiante.

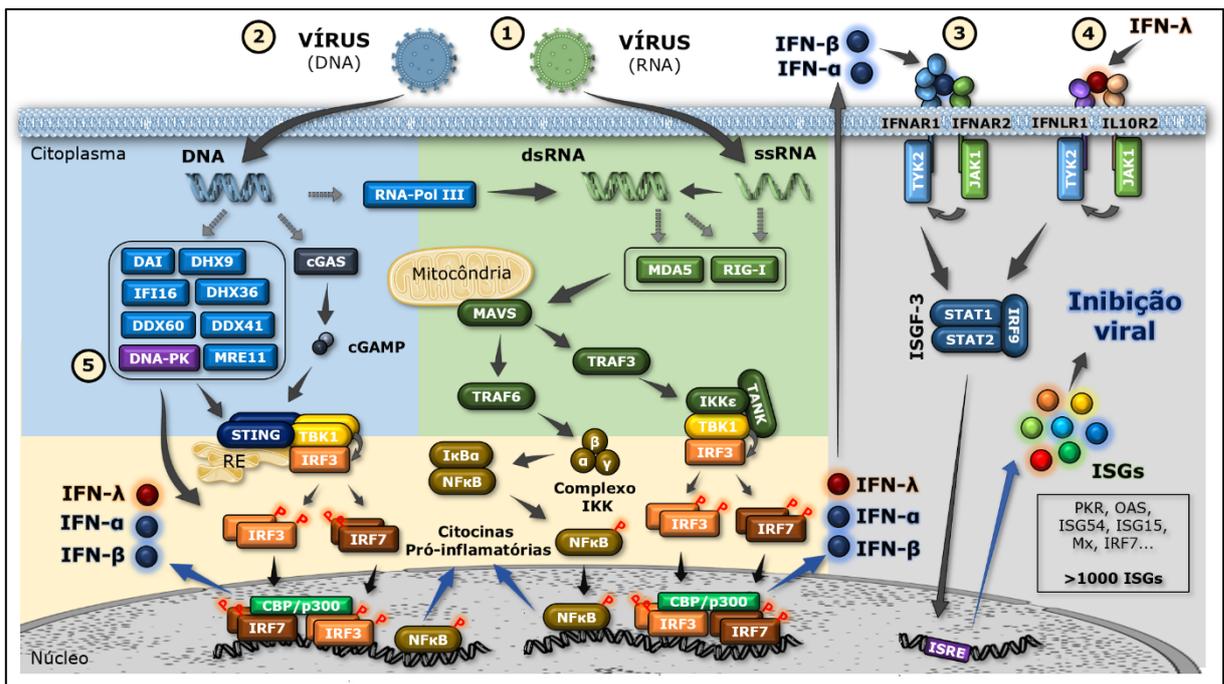


Figura 1. Desenho esquemático da produção e ação do interferon por sensores citoplasmáticos. Os ácidos nucleicos virais (RNA e DNA) induzem transcrição de IFN-I e IFN-III por vias distintas. **(1)** O RNA é detectado pelos sensores de RNA, que ativam a proteína adaptadora MAVS, estimulando o eixo TRAF3/IKKε/TBK1 (associados com a proteína TANK), os quais fosforilam IRF3 e IRF7, que permitem sua translocação para o núcleo, no qual se ligam ao coativador CBP/p300 e posteriormente ativam a transcrição dos IFN-I e IFN-III. A ativação da MAVS também estimula a via do NF-κB através da proteína TRAF6, que ativa o complexo IKK (α, β e γ), o qual promove a fosforilação de IκBα, inibidor constitutivo do fator de transcrição NF-κB, resultando em sua degradação pelo proteassoma. Em consequência, o NF-κB transloca-se para o núcleo, induzindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. **(2)** O DNA é detectado por diferentes sensores de DNA, dentre eles o cGAS, o qual sintetiza o segundo mensageiro cGAMP que atua ativando STING. Os demais sensores ativam STING de maneira direta ou indireta. Após a ativação de STING, ocorre a sua dimerização e a sua translocação do retículo endoplasmático (RE) para regiões perinucleares (não demonstrado), na qual recruta TBK1, o que possibilita a ativação de IRF3 e IRF7, os quais translocam-se para o núcleo e se ligam na região promotora de IFN-I e IFN-III juntamente com o cofator CBP/p300. **(3-4)** Os interferons secretados atuam de maneira autócrina e parácrina (não demonstrado), ligam-se em seu receptor comum, no qual os IFN-I ligam-se em IFNAR1/IFNAR2 e os IFN-III se ligam em IFNLR1/IL10R2. A ligação aos receptores ativa a via JAK-STAT, a qual induz o recrutamento de IRF9, formando o fator ISGF-3 e permitindo sua translocação para o núcleo. O ISGF-3 liga-se na região promotora ISRE e inicia a regulação da transcrição de mais de 1000 genes estimulados por IFN (ISGs), um arsenal proteico, o qual inibe a replicação viral por mecanismos distintos. A RNA Polimerase III (RNA-Pol III), detecta DNA no citoplasma e o transcreve para RNA, o qual ativa a via dos sensores de RNA. **(5)** O complexo DNA-PK também induz a fosforilação de IRF3 de maneira independente de TBK1 e STING. Fonte: o autor.

1.1 INTERFERON

Os IFNs são potentes citocinas que induzem a produção de um arsenal proteico responsável por inibir a replicação de um amplo espectro de microrganismos, principalmente os vírus. No final da década de 50, Isaacs e Lindenmann caracterizaram um fenômeno conhecido como “interferência viral”, que foi amplamente estudado desde os anos 30. A “interferência viral” é um fenômeno pelo qual células infectadas por um vírus tornam-se resistentes contra uma segunda infecção causada por um segundo vírus. Foi demonstrado que

o agente causador da “interferência viral” era um composto de origem intracelular, produzido e secretado por células infectadas, denominado “interferon” (ISAACS; LINDENMANN, 1957).

Com o surgimento das técnicas de sequenciamento e clonagem no final dos anos 70, foi possível caracterizar os diferentes tipos de IFNs, os quais foram subdivididos em três grupos: IFN- α (com pelo menos 13 subtipos), IFN- β e IFN- γ (ALLEN; FANTES, 1980; DERYNCK et al., 1980; GRAY; GOEDDEL, 1982; STREULI; NAGATA; WEISSMANN, 1980). Os IFNs foram diferenciados através do peso molecular, pela sequência de aminoácidos (sendo que IFN- β possui alta homologia com o IFN- α) e pelos tipos de indutores. Com base nessas diferenciações, os IFN- α e IFN- β foram classificados como IFN do tipo I (IFN-I), os quais não possuem íntrons em seus genes e são induzidos por ácidos nucleicos em praticamente todas as células nucleadas. O IFN- γ foi classificado como IFN do tipo II (IFN-II), o qual contém íntrons em seu gene e sua expressão é estimulada em linfócitos por antígenos e mitógenos (ex. concanavalina A) (FALCOFF, 1972). Posteriormente, foram caracterizados o IFN- ω , adicionado aos IFN-I; e o IFN- λ (IFN- λ 1-4), classificado como IFN do tipo III (IFN-III), o qual compartilha características antivirais semelhantes ao IFN-I (HAUPTMANN; SWETLY, 1985; KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003).

1.1.1 Interferons do tipo I

Os IFN-I são constituídos por diferentes subtipos, dentre eles os IFN- α e o IFN- β são os mais estudados. A indução dos IFN-I ocorre após a liberação dos ácidos nucleicos virais (RNA ou DNA) no meio intracelular, os quais são detectados por sensores citoplasmáticos distintos, ativando a via de sinalização dos sensores de RNA ou a via dos sensores de DNA. Essas duas vias convergem para a ativação dos mesmos fatores de transcrição dos IFN-I. Uma vez estimuladas, as células secretam os IFN-I para o meio extracelular, onde atuam de maneira autócrina e parácrina, se ligando em seu receptor comum constituído pelo heterodímero *interferon alpha receptor 1* (IFNAR1) e IFNAR2 (KIM et al., 1997; NOVICK; COHEN; RUBINSTEIN, 1994; OWCZAREK et al., 1997; UZÉ; LUTFALLA; GRESSER, 1990). Após a ligação ao receptor, ocorre a ativação das proteínas *janus kinase 1* (JAK1) e *tyrosin-protein kinase 2* (TYK2), ambas pertencem à família JAK, as quais são caracterizados por estarem acopladas aos receptores (FIRMBACH-KRAFT et al., 1990; MCKENDRY et al., 1991; MÜLLER et al., 1993; VELAZQUEZ et al., 1992). A fosforilação das proteínas JAK induz a

ativação do complexo *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF-3), formado por duas proteínas da família *signal transducers and activators of transcription* (STAT), STAT1 e STAT2. A interação entre as proteínas da família JAK e as proteínas da família STAT é comum dentre as vias ativadas por citocinas, dessa forma, essa interação é conhecida como via JAK-STAT. Uma vez ativado, o complexo ISGF3 recruta a proteína *interferon-regulatory 9* (IRF9), induzindo a translocação de ISGF3-IRF9 do citoplasma para o núcleo, no qual as proteínas STAT se ligam em regiões conhecidas como *IFN-stimulated response element* (ISRE) localizadas na região promotora dos *IFN-stimulated genes* (ISG) (DALE et al., 1989; FU et al., 1992; KESSLER; LEVY; DARNELL, 1988; LEVY et al., 1988). Os ISGs são responsáveis, dentre outras funções, por respostas diretas contra as diversas etapas da replicação dos vírus (TEIJARO, 2016). A via de sinalização dos IFN-I está ilustrada na **Figura 1 (parte 3)**.

1.1.2 Interferons do tipo III

Os IFN-III são constituídos pelos IFNs- λ (IFN- λ 1 ao IFN- λ 4). Em camundongos, os IFN- λ 1 e IFN- λ 4 não são funcionais, sendo considerados pseudogenes. Essa família de IFN compartilha características semelhantes aos IFN-I, os quais são induzidos por ácidos nucleicos e posteriormente são secretados, se ligando em um receptor distinto, constituído pelo heterodímero *interferon lambda receptor 1* (IFNLR1) e *interleukin-10 receptor 2* (IL-10R2) (SYEDBASHA; EGLI, 2017). Esse receptor estimula a mesma via JAK-STAT dos IFN-I, o qual resulta na transcrição dos mesmos ISGs. As principais diferenças entre IFN-I e IFN-III são as células produtoras/receptoras, e o tempo de indução dos diferentes ISGs, sendo ambos importantes para a resposta antiviral. As principais produtoras de IFN- λ são as células epiteliais, hepatócitos e alguns tipos de células mielóides, como neutrófilos (LAZEAR; SCHOGGINS; DIAMOND, 2019). IFN- λ regula a expressão dos mesmos ISGs comparado com IFN-I, porém possui uma resposta com menor potência e com uma duração mais prolongada (PERVOLARAKI et al., 2018; VOIGT; YIN, 2015). A via de sinalização dos IFN-III está ilustrada na **Figura 1 (parte 4)**.

1.2 GENES ESTIMULADOS POR IFN

No início dos anos 80, foram caracterizadas proteínas antivirais cuja expressões estavam diferencialmente expressas sob estímulo dos IFN-I, sendo classificadas como os primeiros ISGs descritos. Dentre eles, a proteína quinase R (PKR), primeiro ISG caracterizado, a qual é ativada por RNA de fita dupla (dsRNA) e resulta na fosforilação do fator de iniciação eIF-2 α , inativando-o, inibindo a síntese proteica viral e celular (DE MAEYER; DE MAEYER-GUIGNARD, 1998; EPSTEIN; TORRENCE; FRIEDMAN, 1980). Na mesma época foi caracterizada a 2'5'-oligo-A sintetase (OAS), que polimeriza ATP na presença de dsRNA e resulta na síntese de 2'5'-oligoadenilatos, os quais ativam endorribonucleases (RNaseL) que clivam tanto RNA viral quanto RNAs mensageiros (mRNA) e ribossomais (rRNA) da célula hospedeira, resultando na inibição da síntese proteica (LENGYEL, 1982). Outros ISGs foram identificados nos anos seguintes como as proteínas Mx (MxA e MxB em humanos), ISG15 e ISG54 (IFIT2). Estimava-se pelo menos 100 diferentes ISGs até o início dos anos 90, porém análises de transcriptomas de células hematopoiéticas de camundongos e chimpanzés revelaram que aproximadamente 1000 ISGs são regulados por IFN-I (KESSLER; LEVY; DARNELL, 1988; LANFORD et al., 2006; MOSTAFAVI et al., 2016; PAVLOVIC et al., 1990; SCHOGGINS et al., 2011).

Conceitualmente, ISGs são genes regulados durante a resposta imune pela família dos interferons, a qual inclui IFN-I, IFN-II e IFN-III. Estima-se que aproximadamente 10 % dos genes que compõem o genoma humano são ISGs, incluindo genes que codificam para proteínas da via dos sensores de RNA e DNA, bem como proteínas associadas com as vias JAK-STAT dos IFNs (levando a uma retroalimentação positiva). Outros ISGs são caracterizados por regular negativamente essas mesmas vias (Ex: USP18), além de genes que não são induzidos apenas pelos IFNs (SCHOGGINS, 2019).

Os ISGs inibem todas as etapas do ciclo de replicação viral, incluindo a ligação, entrada, replicação, transcrição, tradução, montagem, saída, brotamento e liberação dos vírus para o meio extracelular. Os múltiplos alvos dos ISGs atribuem aos IFNs toda sua importância durante o controle de infecções, não limitados aos vírus, mas também em resposta a outros patógenos intracelulares, como bactérias e protozoários (CHEMUDUPATI et al., 2019; SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014; SCHOGGINS, 2019). Um desenho esquemático demonstrando os diferentes alvos dos ISGs ilustra as principais propriedades antivirais contra a replicação de um vírus com genoma de RNA (**Figura 1**).

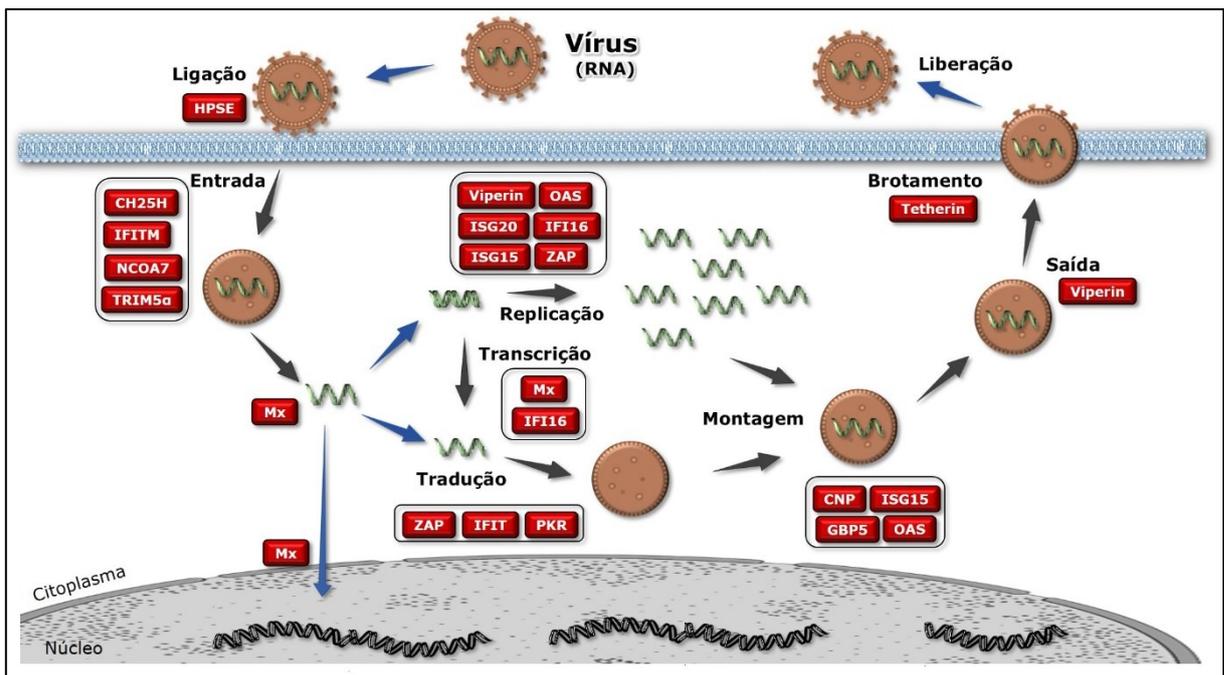


Figura 2. Diferentes alvos dos ISGs (*IFN-stimulated genes*) no ciclo de replicação viral. A enzima HPSE (heparanase) atua no bloqueio da etapa de ligação de diferentes vírus à membrana celular. A CH25H (cholesterol 25-hydroxylase), IFITMs (interferon-inducible transmembrane), NCOA7 (nuclear receptor coactivator 7) e TRIM5 α (tripartite motif-containing protein 5) bloqueiam a entrada dos vírus por mecanismos distintos. As proteínas da família da Mx (myxovirus resistance proteins) têm como alvo as fitas negativas de vírus de RNA, também atuando na inibição da translocação do genoma viral para o núcleo e inibição do alongamento transcricional. Além de ser um sensor de DNA, o IFI16 (gamma-interferon-inducible protein 16) também atua como um ISG na inibição da transcrição de vírus de DNA. As proteínas da família dos IFITs (interferon-induced proteins), além da PKR (protein kinase R) e ZAP (zinc antiviral protein) atuam no bloqueio da tradução viral. A etapa de replicação do genoma viral pode ser inibida pelas ISGs Viperin (virus inhibitory protein), endoplasmic reticulum-associated, IFN-inducible), ISG20, ISG15, IFI6, ZAP e OAS (oligoadenylate synthetase). As proteínas ISG15, OAS, CNP (2'3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) e GBP5 (guanylate binding protein 5) bloqueiam a montagem do vírus. Por fim, as etapas de saída e brotamento são inibidas por Viperin e Tetherin, respectivamente. Fonte: o autor.

1.3 VIA DOS SENSORES DE RNA

A identificação das proteínas responsáveis pela detecção do genoma viral e transdução de sinal para produção dos IFNs começou com a descoberta dos receptores do tipo *Toll-like receptors* (TLR) (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997), posteriormente caracterizados por serem receptores de superfície ou de vesículas endossomais. Alguns subtipos de TLRs localizados em endossomos reconhecem RNA de origem extracelular, como por exemplo o TLR3 que reconhece dsRNA e o TLR7/TLR8 que reconhece RNA de fita simple (ssRNA), que uma vez ativados, estimulam a produção de IFN-I e IFN-III (ALEXOPOULOU et al., 2001; DIEBOLD et al., 2004; HEIL et al., 2004; LUND et al., 2004). No entanto, a maior parte do RNA viral acumula-se no meio intracelular, onde é detectado por sensores citoplasmáticos, como a proteína *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I), a qual possui

um domínio RNA helicase em sua constituição e é capaz de se ligar à RNA viral ou sintético, transduzindo o sinal para a expressão dos IFNs. Essa transdução ocorre através de outro domínio chamado *caspase recruitment domain* (CARD), o qual é exposto após a mudança de conformação dependente da ligação de RNA e de ATP. Por homologia à RIG-I, outras duas helicases foram identificadas, *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) e *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2), porém apenas MDA5 apresenta o domínio CARD, essencial para a transdução de sinal. Nesse contexto, foi demonstrado que a função de LGP2 é regular negativamente os sensores RIG-I e MDA5 (ROTHENFUSSER et al., 2005; YONEYAMA et al., 2005). Além disso, RIG-I e MDA5 reconhecem tipos de RNA diferentes, os quais estão associados ao tamanho do genoma ou a composição, uma vez que o RIG-I detecta ssRNA com trifosfato na porção 5' e fitas curtas de dsRNA, enquanto que MDA5 detecta fitas longas de dsRNA (KATO et al., 2006, 2008). Adicionalmente, mitocôndrias danificadas podem liberar o dsRNA mitocondrial para o citosol, o qual também é reconhecido pelos sensores de RNA (DHIR et al., 2018). Os sensores citoplasmáticos de RNA são classificados como *RIG-I-like receptors* (RLR).

Através do domínio CARD, os RLRs ativam uma proteína adaptadora chamada *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS), também conhecida como *CARD adaptor inducing IFN- β* (Cardif), *interferon- β promoter stimulator 1* (IPS-1) ou *virus-induced signaling adaptor* (VISA) (KAWAI et al., 2005; MEYLAN et al., 2005; SETH et al., 2005; XU et al., 2005). Essa proteína apresenta um domínio transmembranar localizado na membrana externa de mitocôndrias, além de apresentar o domínio CARD, pela qual a MAVS liga-se aos RLRs. A proteína MAVS atua como uma bifurcação, pois além de estimular os IFN-I e IFN-III, também ativa outra via chamada de *factor nuclear kappa B* (NF- κ B), a qual leva à transcrição de citocinas pró-inflamatórias (TEIJARO, 2016). Para induzir a transcrição do IFN-I e IFN-III, a via segue da proteína MAVS para a ativação de outra proteína intermediária denominada *TNF receptor-associated fator 3* (TRAF3) (OGANESYAN et al., 2006; SAHA et al., 2006). Ao receber o sinal de MAVS, a proteína TRAF3 transmite esse sinal para um complexo de proteínas quinases constituídas por *I κ B kinase ϵ* (IKK ϵ) e *Tank-binding kinase 1* (TBK1). A proteína TBK1 é descrita como essencial para a indução de IFN-I e IFN-III, tanto pela via dos sensores de RNA quanto pela via dos sensores de DNA, atuando na fosforilação do fator de transcrição denominado IRF3 (TEIJARO, 2016).

O fator de transcrição IRF3 localiza-se no citoplasma, onde é fosforilado por TBK1 durante infecções virais, induzindo sua dimerização e translocação para o núcleo, no qual se

liga ao coativador chamado CBP/p300, responsável pela estabilidade do IRF3 no núcleo. Esse fator de transcrição se liga na região promotora dos IFN-I e IFN-III, resultando na transcrição dos mesmos (AU et al., 1995; JUANG et al., 1998; LIN et al., 1998; YONEYAMA et al., 1998). Além do IRF3, o fator de transcrição IRF7 também induz a transcrição dos IFN-I e IFN-III após ativação por TBK1, porém o IRF7 é classificado como uma ISG cuja expressão ocorre após a produção dos IFNs. Além disso, o IRF7 é o principal fator de transcrição que estimula a expressão de IFN- α (MARIÉ; DURBIN; LEVY, 1998; SATO et al., 2000; WATHELET et al., 1998).

Os fatores de transcrição IRF3 e IRF7 são os principais indutores de IFN-I e IFN-III. Entretanto, outros IRFs também se ligam na região promotora de IFN-I ativando a transcrição. Foi demonstrado que, durante algumas infecções virais, o IRF5 atua com uma função similar ao IRF7 ao induzir alguns subtipos de IFN- α (ANDRILENAS et al., 2018; BARNES; MOORE; PITHA, 2001). O IRF1 também é descrito como um fator de transcrição para IFN-I e IFN-III, apesar de não ser essencial para a sua indução (DOU et al., 2014; PANDA et al., 2019). A via de sinalização dos sensores de RNA está ilustrada na **Figura 1 (parte 1)**.

1.4 VIA DOS SENSORES DE DNA

A indução de IFN-I e IFN-III pelos sensores de DNA também ocorre através da ativação do complexo TBK1/IRF3. Diferente da via dos sensores de RNA, a proteína TBK1 é ativada pela proteína adaptadora chamada de *stimulator of interferon genes* (STING) (ISHIKAWA; BARBER, 2008) ou *mediator of IRF3 activation* (MITA) (ZHONG et al., 2008). STING é considerado essencial para a indução de IFN-I e IFN-III durante o estímulo por DNA, localizando-se no retículo endoplasmático na sua forma inativa e, após ativação, migra para vesículas perinucleares onde se liga à proteína TBK1 possibilitando a ativação de IRF3 (ISHIKAWA; MA; BARBER, 2009).

Até a metade dos anos 2000, o receptor endossomal TLR9 era o único receptor de DNA conhecido, o qual detecta DNA de origem extracelular (HEMMI et al., 2001). A proteína *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* (DAI) foi o primeiro sensor de DNA citoplasmático descrito, sendo que a superexpressão dessa proteína aumenta a expressão dos IFN-I quando estimulados por DNA, mas sem efeito sob estímulo de RNA (TAKAOKA et al., 2007). Além de DAI, a RNA polimerase III (RNA-Pol III) também foi descrita como um sensor intracelular de DNA, esse sensor converte o DNA citosólico em RNA com 5'-trifosfato, o qual

é posteriormente detectado por RIG-I e ativa a via canônica dos sensores de RNA (CHIU; MACMILLAN; CHEN, 2009). Até o final de 2013 foram identificados pelo menos 12 sensores de DNA distintos, tais como cGAS, AIM2, IFI16, DHX9, DHX36, DDX41, DDX60, MRE11 e o complexo DNA-PK, além dos já citados (DAI e RNA-Pol III) (BÜRCKSTÜMMER et al., 2009; FERGUSON et al., 2012; FERNANDES-ALNEMRI et al., 2009; HORNUNG et al., 2009; KIM et al., 2010; KONDO et al., 2013; MIYASHITA et al., 2011; SUN et al., 2013; UNTERHOLZNER et al., 2010; ZHANG et al., 2011b).

Os trabalhos que descreveram os diferentes sensores de DNA evidenciaram que essas vias são dependentes de STING, TBK1 e IRF3 para a indução de IFN-I, porém a ativação de STING não ocorre apenas pelos sensores de DNA. Foi demonstrado que dinucleotídeos cíclicos derivados de bactérias (c-di-AMP e c-di-GMP) atuam como segundos mensageiros que ativam a via de IFN-I por meio de sua ligação direta em STING, induzindo sua dimerização e posteriormente o recrutamento de TBK1 (BURDETTE et al., 2011; OUYANG et al., 2012; SAUER et al., 2011; WOODWARD; IAVARONE; PORTNOY, 2010). Portanto, além de transmitir o sinal dos sensores de DNA, STING também atua como um sensor de dinucleotídeos cíclicos. Ainda, foi demonstrado que na presença de DNA citosólico, as células eucarióticas também são capazes de sintetizar um dinucleotídeo cíclico denominado *cyclic GMP-AMP* (cGAMP) em uma reação dependente de ATP e GTP, sendo este mais potente em induzir a expressão de IFN-I em comparação com c-di-AMP e c-di-GMP (WU et al., 2013). O sensor de DNA *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) é a enzima responsável pela síntese de cGAMP (SUN et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que o cGAMP produzido pelas células pode ser transferido para as células adjacentes através de canais chamados de *gap junctions*, permitindo a indução dos IFNs nas células vizinhas de maneira independente de infecção (ABLASSER et al., 2013).

Dentre os diversos sensores de DNA descritos, a via de cGAS-STING é considerada a via canônica, pois foi demonstrado como sendo essencial para indução da expressão de IFN-I em resposta à DNA em diferentes células e espécies. Além disso, o mecanismo de ação através da síntese de cGAMP, o qual atua ligando-se em STING, é crítica para transmissão de sinal para TBK1 e para posterior ativação do fator de transcrição IRF3, induzindo a transcrição dos IFN-I (VANCE, 2016). cGAS possui capacidade de ligação ao DNA de diferentes origens, inclusive DNA mitocondrial, o qual é liberado por mitocôndrias danificadas durante infecções causadas por vírus de ambos os genomas (DNA e RNA) (SUN et al., 2017). Estudos mais recentes avançaram no detalhamento da dinâmica de comunicação entre as proteínas que

constituem as vias dos sensores intracelulares, como proteínas acessórias, proteínas transportadoras e sítios de ativação ou inibição, principalmente relacionadas à cGAS e STING (HU; SHU, 2020). Contudo, a caracterização dos outros sensores de DNA descritos permanece pouco elucidada. A via de sinalização dos sensores de DNA está ilustrada na **Figura 1 (parte 2)**.

1.5 COMPLEXO DNA-PK

O complexo DNA-PK é composto pelas proteínas Ku70, Ku80 e pela subunidade catalítica DNA-PKcs, uma proteína com alto peso molecular com cerca de 450 kDa. Sua principal função concentra-se no reparo eficiente de DNA com quebra na dupla fita (DSB - *double-strand DNA break*) e na recombinação V(D)J, o qual é importante para geração da diversidade dos receptores dos linfócitos T e B. Essas duas funções são realizadas através de uma reação de recombinação não-homóloga chamada NHEJ (*Non-homologous end joining*). As proteínas Ku possuem a capacidade de ligação à porção terminal em fitas de DNA danificado, permitindo a posterior ligação e ativação da DNA-PKcs. A ativação de DNA-PKcs ocorre por autofosforilação e em múltiplos sítios, incluindo Thr2609 e Ser2056, o qual inicia o processo de reparo de DNA (GU et al., 1997; NUSSENZWEIG et al., 1996).

Durante infecções por vírus com genoma de DNA, o complexo DNA-PK alterna sua função para sensor de DNA no citoplasma, resultando na indução dos IFNs. As proteínas Ku70 e Ku80 se ligam ao DNA citoplasmático sintético ou derivado de vírus, estimulando a transcrição de IFN-I de maneira dependente de STING, TBK1 e IRF3, e independente de outros sensores como os TLRs, DAI e RNA-Pol III. Contudo, a expressão de IFN-I induzido por vírus de RNA ou RNA sintético, ocorre de maneira independente de DNA-PK (FERGUSON et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que diferentemente do que ocorre com as células murinas, as células humanas estimuladas com DNA ativam IRF3 e induzem a transcrição de IFN- β , de maneira independente de TBK1 e STING, mas dependente do complexo DNA-PK. Isso ocorre após a ligação do DNA-PK nas porções terminais da fita de DNA, levando a sua ativação e posterior fosforilação da proteína *heat shock protein A8* (HSPA8), a qual fosforila e ativa IRF3 (BURLEIGH et al., 2020). Ademais, foi demonstrado que o complexo DNA-PK também contribui para a expressão de IFN-III durante estímulo por DNA exógeno ou de origem viral, através de mecanismos não elucidados (SUI et al., 2017; ZHANG et al., 2011a). A via de

sinalização do complexo DNA-PK como sensor de DNA está ilustrada na **Figura 1 (parte 2 e 5)**.

O complexo DNA-PK localiza-se majoritariamente no núcleo, porém também é encontrado no citoplasma (FERGUSON et al., 2012; KOTULA et al., 2013). Além das funções já citadas, esse complexo também possui outras funções e em diferentes localidades da célula, os quais são pouco elucidadas. Dentre essas funções, foi evidenciado que o complexo DNA-PK possui um papel no metabolismo de RNA, regulando a biogênese de rRNA e *splicing* alternativo de mRNA (LIU et al., 2019; SHAO et al., 2020). Além disso, as proteínas Ku do complexo, possuem propriedades de ligação em RNA, com impacto celular pouco caracterizado (YOO; DYNAN, 1998).

1.6 ZIKA VIRUS

O *Zika virus* (ZIKV) é um vírus envelopado com aproximadamente 50 nm de diâmetro, possuindo um genoma de ssRNA, senso positivo e pertence ao gênero *Flavivirus*, da família dos *Flaviviridae*. Esse vírus foi descoberto em 1947 infectando macacos da floresta Zika (Uganda, África), sendo descrito em humanos infectados a partir de 2007 em alguns países, atingindo um estado de epidemia em 2015, afetando o Brasil, principalmente na região nordeste. O ZIKV se tornou um grande problema de saúde pública devido às graves complicações como a síndrome de Guillain-Barré e a infecção congênita, causando microcefalia em recém nascidos (MASMEJAN et al., 2020).

O ZIKV é um arbovírus, cuja transmissão ocorre através de mosquitos do gênero *Aedes* como o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Todavia, a transmissão do ZIKV também pode ocorrer de maneira congênita, sexual, por transfusão de sangue, por órgãos de pacientes transplantados e por contato com fluidos contaminados como urina e saliva (MASMEJAN et al., 2020).

A replicação do ZIKV ocorre inteiramente no citoplasma celular, onde o seu RNA é codificado para uma poliproteína, a qual é posteriormente clivada em três proteínas estruturais, a proteína Envelope (E), a precursora de membrana (prM) e a proteína capsídeo (C); além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As funções das proteínas não estruturais (NS) estão relacionadas ao processo de replicação viral e evasão à resposta antiviral da célula hospedeira.

A proteína NS1 é um cofator importante para o processo inicial da replicação e colocaliza-se com o RNA do vírus, além de outros componentes do complexo replicativo. Além

disso, NS1 também é secretada para o meio extracelular, onde pode ativar e ser endocitada pelas células adjacentes (MULLER; YOUNG, 2013).

A proteína NS2 é dividida em duas proteínas (NS2A e NS2B). Durante a infecção, a proteína NS2A integra-se à membrana do retículo endoplasmático (RE) e exerce múltiplas funções associadas, principalmente ao processo de replicação do RNA e à montagem do virion. A dissociação entre NS2A e NS2B ocorre por autoproteólise da NS2B após a conjugação com a NS3. A proteína NS2B é um cofator e atua como heterodímero através de uma ligação não covalente na protease NS3 formando o complexo NS2B3. A atividade proteolítica de NS2B3 é responsável pela clivagem da poliproteína nas regiões NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4B-NS5, bem como a proteína estrutural C. Além disso, NS2B3 atua na clivagem de proteínas associadas com a resposta antiviral como cGAS e STING. Esse complexo proteico também ativa a via pró-inflamatória de NF- κ B, ao mediar a clivagem do inibidor I κ B- α (GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018).

A proteína NS4 é dividida em NS4A e NS4B, sabe-se que a NS4A se localiza em vesículas derivadas do RE, juntamente com RNA viral e as proteínas E e NS3, sua função está associada à formação de importantes membranas derivadas da junção entre o RE e o complexo de Golgi, estruturas características dos flavivirus que atuam como sítios de replicação viral. A proteína NS4A também regula a resposta imune ao inibir TBK1 diminuindo a expressão de IFN-I. Além disso, a proteína NS4B também inibe a via de sinalização dos IFN-I e IFN-III, ao bloquear a fosforilação de STAT1 (GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018).

A NS5 é a proteína mais conservada entre os flavivirus, a qual possui dois principais domínios. O domínio N-terminal de NS5 tem a função de metiltransferase e o domínio C-terminal possui a função de RNA polimerase dependente de RNA. As principais funções da NS5 estão relacionadas à replicação do genoma viral (geração de cópias de fitas de RNA senso positivo e negativo), metilação da região 5'-*não traduzida* (5'-UTR – *Untranslated region*) do RNA viral (capeamento) e modulação da via dos IFNs (inibindo a fosforilação da proteína STAT2) (WANG et al., 2018). Além disso, a proteína NS5 também transloca-se do citoplasma para o núcleo, no qual possui funções pouco elucidadas relacionadas à modulação do sistema imune e ao metabolismo de RNA como o *splicing* alternativo (TAN et al., 2019).

Os vírus ZIKV e DENV possuem um genoma de ssRNA, os quais ativam a via dos sensores de RNA. No entanto, análises de proteínas diferencialmente expressas durante a infecção por DENV apontam para uma regulação na expressão do complexo DNA-PK, um sensor de DNA (MIAO et al., 2019). Além disso, a região 5'-UTR do RNA de DENV induz

alterações na atividade e na localização do complexo DNA-PK (VETTER et al., 2012). Também foi identificado uma interação entre o complexo DNA-PK e o RNA de ZIKV, de DENV e até mesmo de *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (FLYNN et al., 2020; OOI et al., 2019). Através de ensaios por imunoprecipitação, resultados preliminares do nosso laboratório também evidenciou a ligação do complexo DNA-PK em RNA de DENV (ANEXO 1). Entretanto, o papel que o complexo DNA-PK exerce durante infecções contra vírus com genoma de RNA (Ex: ZIKV ou DENV) permanece não elucidado. Dessa forma, hipotetiza-se que a proteína DNA-PKcs potencializa a resposta antiviral durante a infecção por ZIKV através da estimulação de vias indutoras de ISGs, resultando no controle mais eficiente da infecção. Portanto, o presente estudo visa avaliar a função do complexo DNA-PK durante infecções por ZIKV, proporcionando a descoberta de novas vias envolvidas no controle de infecções, além de enriquecer informações relacionadas às vias dos sensores citoplasmáticos de ácidos nucleicos.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Avaliar a função da proteína DNA-PKcs durante a resposta celular contra a infecção por *Zika virus*.

1.7.2 Objetivos Específicos

- I- Analisar o impacto da proteína DNA-PKcs na susceptibilidade celular pelo *Zika virus*;
- II- Avaliar a interação entre a proteína NS5 de ZIKV e DNA-PKcs no *splicing* alternativo de RNA;
- III- Analisar o envolvimento da proteína DNA-PKcs na via dos interferons do tipo I e III durante a infecção por *Zika virus*;
- IV- Estudar os mecanismos de ativação de DNA-PKcs durante a infecção por *Zika virus*;
- V- Analisar o impacto da via dos sensores de RNA na indução dos interferons do tipo I e III durante a infecção por *Zika virus*.

2 METODOLOGIAS

2.1 REAGENTES

NU7441 (Petrotech®), inibidor da função quinase da proteína DNA-PKcs, foi eluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC®) na concentração de 7,26 mM, sendo utilizado na concentração entre 0,5 e 10 µM durante os experimentos.

2.2 CÉLULAS

Foram utilizadas células da linhagem A549 (células epiteliais derivadas de pulmão humano – ATCC, CCL-185) e células VERO (células epiteliais derivadas de rim de macaco verde africano – ATCC, CCL-81). Essas células foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12* (DMEM-F12) (GIBCO®), suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO®), 1 % de Penicilina/Streptomicina (Pen/Strep) (GIBCO®) e 2,5 % de 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (GIBCO®), incubadas em estufa úmida à 37 °C e 5 % de CO₂. Também foram utilizadas células da linhagem C6/36 (células de mosquitos *Aedes albopictus* – ATCC, CRL-1660), mantidas em meio *Leibovitz's L15* (L-15) (GIBCO®) e suplementado com 10 % de SFB, 0,26 % de triptose (Thermo®), 1% de Pen/Strep e 2,5 % de HEPES, incubadas à temperatura de 28 °C. Ambas as linhagens celulares foram testadas mensalmente para contaminação por micoplasma.

2.3 VÍRUS

2.3.1 Preparação de estoque viral

Células C6/36 foram mantidas em garrafas de cultura de 150 cm². Ao atingir a confluência de 80 % (aproximadamente 1 x 10⁸ células), as células foram infectadas por ZIKV BR 2015/15261 (STROTTMANN et al., 2019), em multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1, mantidas em meio L-15, suplementado com 10 % de SFB, 0,26 % de triptose e 2,5 % de HEPES, à 28 °C por 6 dias. Após o período de expansão do vírus, o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado em 460 x g por 10 min à 4 °C, aliqüotado em microtubos e armazenados à -80 °C. A quantificação do vírus foi realizada por ensaio de placa. Uma garrafa de células C6/36 não

infectada foi mantida por 6 dias à 28 °C, no qual o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como o controle negativo dos experimentos (*Mock*).

2.3.2 Ensaio de placa

Os sobrenadantes de células infectadas por vírus, derivados dos experimentos, foram coletados e mantidos à -80 °C até a realização do ensaio de placa. Para o ensaio, os sobrenadantes foram descongelados e diluídos por diluições seriadas de ordem 10 em microtubos contendo meio DMEM-F12, suplementado com 2 % de SFB e 2,5 % de HEPES. Cada diluição foi transferida para células da linhagem VERO, na confluência de 80 %, previamente semeadas em placas de cultura de 24 poços. Em seguida, as células foram incubadas por 90 minutos à 37 °C, em 5 % de CO₂. Após esse período, o meio foi removido e lavado com solução salina, sendo posteriormente adicionado DMEM-F12 semissólido (1 % SFB, 1 % Pen/Strep e 1,6 % de carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich®). O objetivo do meio semissólido é para que os vírus liberados infectem as células adjacentes, formando uma placa de lise celular. As placas de cultura permaneceram incubadas por 5 dias em estufa úmida à 37°C e em 5% de CO₂, as quais foram fixadas com 3 % de paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich®) por 15 min à temperatura ambiente (TA). As células foram lavadas três vezes com água corrente em fluxo baixo e incubadas com solução de cristal violeta (2,5 g de cristal violeta [Sigma®], 80 mL de formamida 40 % [Fluka analytical®], 1,7g de cloreto de sódio [Neon®] e 223 mL de etanol absoluto [Êxodo científica®]) durante 30 minutos à TA. Em seguida, as placas foram novamente lavadas em água corrente para remoção do excesso de cristal violeta. Após a secagem das placas, as unidades formadoras de placas (PFU – *Plaque-forming unit*) foram contadas. O resultado é expresso em PFU / mL.

2.3.3 Infecção viral

As células foram pré-incubadas 24 horas à infecção em placas de cultura de 12 poços. No dia seguinte, o inóculo viral foi preparado em meio DMEM F-12, suplementado com 2 % de SFB e 2,5 % de HEPES. O inóculo foi diluído conforme a necessidade do experimento e transferido para a placa de cultura contendo as células pré-incubadas, em aproximadamente 80 % de confluência. Foi determinado o tempo de 90 minutos para a adsorção dos vírus nas células, sendo posteriormente lavadas com solução salina (0,9 % de NaCl – Eurofarma®) para remoção

de vírus defectivos e não adsorvidos. As culturas de células infectadas foram mantidas em meio DMEM-F12, suplementado com 5 % de SFB e 2,5 % de HEPES, por tempos variáveis de acordo com o experimento realizado.

2.4 CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram transferidas para microtubos e centrifugadas em 460 x g por 5 min à 4 °C. O sobrenadante foi completamente removido e em seguida foi adicionado o marcador de viabilidade celular *Zombie NIR™ Fixable Viability Kit* (BioLegend®) diluído 1:2000 em solução salina por 20 min. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina, centrifugando em 460 x g por 5 min à 4 °C. As células foram fixadas com 3 % de PFA por 20 minutos, seguidas por centrifugação em 460 x g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi completamente removido, sendo posteriormente adicionado o anticorpo anti-proteína E de Flavivírus (4G2), conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:400 em tampão de permeabilização (0,25 % de Saponina [Dinâmica®] em PBS 1X) por 90 min, à TA. Após esse período, as amostras foram lavadas com solução salina, seguido por centrifugação em 460 x g por 5 min e suspendidas novamente em solução salina, permanecendo em gelo até a aquisição no citômetro de fluxo FACSVerse (BD®). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software FlowJo-VX v.10.1 (TreeStar®). A estratégia de *gate* foi realizada para exclusão de células lisadas, células além do limite de detecção, células agrupadas (em dupletos ou em grumos) e células autofluorescentes (**Figura 3**), ambas as exclusões aumentam a confiabilidade da análise. Essa estratégia foi utilizada em todos os experimentos de citometria.

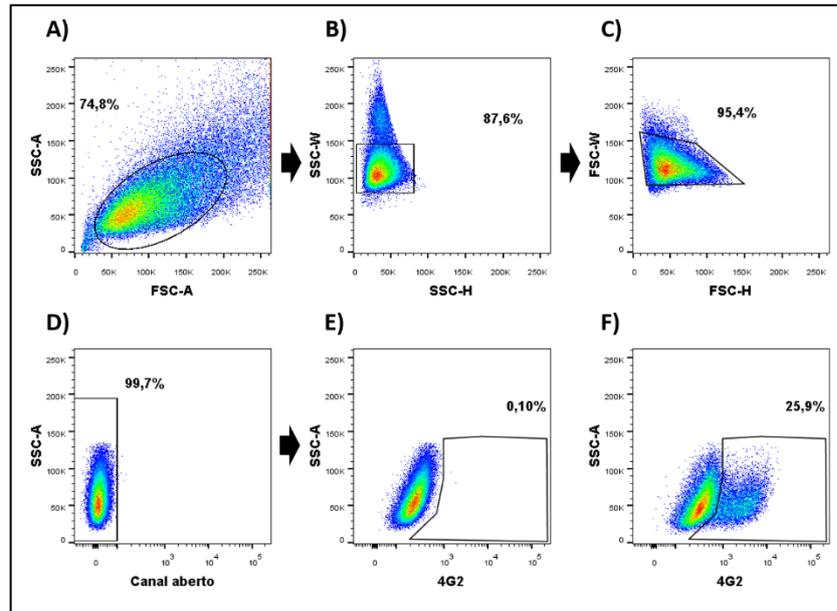


Figura 3. Estratégias de *gates* para análise de citometria de fluxo. **A)** Exclusão de *debris* celulares. **B-C)** Exclusão de células em grumos. **D)** Exclusão de células autofluorescentes. **E)** Células infectadas sem a marcação com 4G2. **F)** Células infectadas e marcadas com 4G2.

2.5 VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Para a realização dos ensaios de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio [Amresco®]), as células foram previamente semeadas em placas de 96 poços (fundo chato). As células foram infectadas por ZIKV ou tratadas com o inibidor NU7441 nas condições determinadas para cada experimento. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 0,5 mg/mL de MTT em 100 μ L foram adicionados por poço. As células foram incubadas por 4 horas em estufa úmida à 37 °C, em 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 100 μ L de DMSO para a extração dos cristais de MTT. Em seguida, as células foram incubadas por 16 horas, protegidas da luz. Os poços foram mensurados na absorbância em 540 nm na Multileitora Biotek (software Gen5 1.10).

2.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram transferidas para placas de 12 poços ou 24 poços (contendo lamínulas circulares (Olen®)). Após a realização do experimento, o sobrenadante das células foi removido e a placa de cultura celular foi lavada três vezes com solução salina. Após a lavagem, as células foram fixadas com 3 % de PFA e incubadas por 20 min à TA. Após a fixação, as células foram novamente lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, as células foram

permeabilizadas com 0,3 % de Triton X-100 (Amresco®) por 5 min. Após o tempo de permeabilização, as células foram lavadas três vezes para, em seguida, serem incubadas com os anticorpos primários em solução de bloqueio (1% de albumina bovina fração V (BSA) [Inlab®], diluído em PBS 1X), nas condições apresentadas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Lista dos anticorpos primários para imunofluorescência e suas respectivas diluições.

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante
4G2	Mouse	1:100	-
DNA-PKcs	Rabbit	1:200	Abcam®
IRF3	Rabbit	1:200	Cell Signaling®
IRF7	Rabbit	1:200	Abcam®
IRF1	Rabbit	1:200	Abcam®
IRF5	Rabbit	1:200	Abcam®
γ H2A.X	Rabbit	1:140	Cell Signaling®
dsRNA	Mouse	1:100	Scicons®

Ambos os anticorpos primários foram incubados por uma hora à TA. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com solução salina, e em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG* (Thermo®), na diluição de 1:2000; *Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG* (Thermo®), na diluição de 1:2000; ou *Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG* (Thermo®), na diluição de 1:2000. Ambos os anticorpos secundários foram incubados por uma hora, à TA e protegidas da luz. Então, as células foram novamente lavadas três vezes com solução salina. Na placa de 12 poços, as células foram incubadas com PBS 1X à 4 °C até a visualização no microscópio invertido (Olympus IX 83). Na placa de 24 poços (contendo lamínulas circulares), as células foram incubadas com uma solução contendo 1 μ g/mL de *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), por 20 minutos, à TA e protegidas da luz. Após nova lavagem com solução salina (três vezes), as lamínulas circulares foram recolhidas e montadas em lâminas de microscopia (Olen®), sobre uma gota de uma solução de ProLong® Gold Antifade Reagent (Molecular Probes®), onde permaneceram incubadas à 4°C até a visualização no microscópio (Olympus Bx 41). A visualização e formatação das imagens foram realizadas através do software *ImageJ*.

2.7 BIOLOGIA MOLECULAR

2.7.1 RT-qPCR

2.7.1.1 Extração de RNA e síntese de cDNA (RT-PCR)

A extração de RNA foi realizada mediante uso de *Trizol reagent* (Ambion®), de acordo com as recomendações do fabricante, sendo estocado à -80 °C até sua utilização. O RNA extraído foi mensurado através do *Nanodrop Lite* (Thermo scientific®), sendo utilizados 500 ng de RNA para tratar com DNase I (Thermo®), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de síntese de cDNA foi realizado através do kit *High capacity cDNA reverse transcription* (Thermo®). As condições da reação podem ser observadas no **Quadro 2**. Após a síntese, as amostras de cDNA foram armazenadas à -20 °C.

Quadro 2. Condições da reação de RT-PCR.

Nº	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Anelamento	25 °C	10 min
2	Extensão	37 °C	2 h
3	Desnaturação	87 °C	5 min

2.7.1.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para todos os experimentos de qPCR, foi utilizado o kit *Gotaq qPCR Master Mix* (Promega®). Com adaptações às recomendações do fabricante, cada reação de PCR continha: 5 µL de *SYBR Green*, 300 nM de cada um dos iniciadores, 0,1 µL de CXR e 2 µL de cDNA (diluído 20 vezes em água ultrapura [GE®]), diluídos em água ultrapura em quantidade suficiente para completar 10 µL. Os iniciadores utilizados e as condições de amplificação podem ser observados nos **Quadros 3 e 4**, respectivamente. A curva de dissociação dos iniciadores foi mensurada em todos os experimentos.

Quadro 3. Iniciadores utilizados na reação de qPCR.

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Eficiência
hGAPDH <i>For</i> hGAPDH <i>Rev</i>	TCGGAGTCAACGGATTTGGT TGAAGGGGGTCATTGTATGGCA	94 %
hIFNB <i>For</i> hIFNB <i>Rev</i>	AAACTCATGAGCAGTCTGCA AGGAGATCTTCAGTTTCGGAGG	99 %
hIFNL1 <i>For</i> hIFNL1 <i>Rev</i>	TTCCAAGCCCACCACAACCTG GAGTGACTCTTCCAAGGCGT	103 %
hCXCL10 <i>For</i> hCXCL10 <i>Rev</i>	ACCTGCATCAGCATTAGTAATC CCTTTCCTTGCTAACTGCTT	97 %
hIRF7 <i>For</i> hIRF7 <i>Rev</i>	GATGTCGTCATAGAGGCTGTTGG TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA	80 %
hNFKBIA <i>For</i> hNFKBIA <i>Rev</i>	TACACCTTGCCTGTGAGCAG TAGCCTTCAGGATCAGGATGGAGTGG	95 %
hIFIT2 <i>For</i> hIFIT2 <i>Rev</i>	GACACGGTTAAAGTGTGGAGG TCCAGACGGTAGCTTGCTATT	97 %
hIFIT3 <i>For</i> hIFIT3 <i>Rev</i>	AGAAAAGGTGACCTAGACAAAGC CCTTGTAGCAGCACCCAATCT	90 %
ZIKV <i>For</i> ZIKV <i>Rev</i>	CTGTGGCATGAACCCAATAG ATCCCATAGAGCACCCTCC	97 %
SRSF1 <i>For</i> SRSF1 <i>Rev</i>	CTTTCGTCACCGCCATGTC TTGGTTCGGATGTCTGGAGG	96 %
SRSF1-AS <i>For</i> SRSF1-AS <i>Rev</i>	AGGCAATGGTTTGGATTGG CCACACGAATGCGGTTTGG	92 %

Quadro 4. Condições de amplificação na reação de qPCR.

Nº	Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	Ativação inicial	95 °C	5 min	1
2	Desnaturação	95 °C	10 seg	40
3	Anelamento e Extensão	60 °C	30 seg	

A transcrição de *GAPDH* foi utilizada como controle endógeno. Todas as reações foram preparadas em placas do tipo *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems®), e a PCR realizada no *Applied Biosystems StepOne™ PCR System*. Os dados de

threshold, *baseline* e *Cq*, foram obtidos e analisados inicialmente através do software *StepOne™ Software v2.1*. A análise da expressão relativa dos genes foi realizado pelo método do $\Delta\Delta Cq$, sendo que os gráficos plotados com os dados foram de acordo com a expressão relativa de cada gene em relação ao controle negativo de cada experimento, ao qual foi atribuído o valor de 1.

2.7.2 Western blot

Para extração proteica, as células foram lavadas com solução salina e destacadas das placas de cultura utilizando *Cell scraper* (BD®) e transferidas para microtubos. Os tubos foram centrifugados em 460 x g, por 5 min à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi removido para adição da solução de lise RIPA contendo inibidor de protease (*Mini Protease Inhibitor Tablets* [Roche®]) e, em alguns experimentos, inibidor de fosfatase (*Phosphatase Inhibitor cocktail tablets* [Roche®]). Os tubos foram incubados por 30 min, sendo que a cada 10 min durante a incubação, os tubos foram vortexados por 30 seg. Em seguida, os tubos foram centrifugados em 13.000 x g, por 10 min à 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e as proteínas foram quantificadas através do kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo®), seguindo as recomendações do fabricante. Após a quantificação, foi adicionado o tampão de corrida 6X, seguido de incubação à 95 °C por 5 min. As amostras foram armazenadas em -20 °C até a sua utilização.

Para corrida em gel SDS-PAGE, foi utilizado 25 µg de proteínas, sendo transferido em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Amersham Protan®). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5 % m/v de leite em pó (Molico, Nestlé®) ou BSA em solução de TBS-T 1X 1 hora em agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T 1X três vezes, por 5 min em cada lavagem e incubada com o anticorpo primário, diluído em TBS-T 1X, suplementado com 5 % m/v de BSA. A lista dos anticorpos primários utilizados e a diluição podem ser observados no **Quadro 4**. A incubação do anticorpo primário foi realizado *overnight*, à 4 °C e sob agitação constante.

Quadro 5. Lista dos anticorpos primários para *Western blot* e suas respectivas diluições.

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante
DNA-PKcs	Rabbit	1:500	Abcam®
β -Actina	Mouse	1:4000	Abcam®
Tubulina	Mouse	1:1000	Millipore®
FLAG	Mouse	1:500	Sigma®
IFIT3	Rabbit	1:1000	ProteinTech®

Após a incubação do anticorpo primário, a membrana foi lavada com TBS-T 1X três vezes, por 5 min cada, e posteriormente incubada por uma hora à TA com o anticorpo secundário acoplado ao HRP anti-mouse IgG (Cell Signaling®), na diluição 1:4000; ou HRP anti-rabbit IgG (Cell Signaling®), na diluição 1:5000. Após a nova incubação, a membrana foi novamente lavada com TBS-T 1X três vezes, por cinco minutos cada, seguida de mais duas lavagens com TBS 1X antes da adição do substrato quimioluminescente ECL ou ECL *Supersignal* (Thermo®).

2.8 ANÁLISE DE *SPLICING* ALTERNATIVO

Para monitorar a transcrição da isoforma derivada de *splicing* alternativo (AS) do gene *SRSF1*, foi realizada a técnica de RT-qPCR utilizando primers específicos para o exon AS (SRSF1-AS). O sinal de SRSF1-AS foi normalizado pela amplificação do exon 1 do gene *SRSF1*, conservado entre as isoformas. As sequências de SRSF1-AS e SRSF1 encontram-se no **Quadro 3**.

2.9 CRISPR/CAS9

Para a geração de células deficientes para o gene *PRKDC*, foram utilizados guias preparados pela empresa *Horizon* (Guia 1 – 5'- CAGACATCTGAACAACCTTTA -3' e Guia 2 5'- TGGAGACTGGCGGCGTGATC -3'), inseridos em vetor contendo a sequência que codifica GFP. Células A549 foram previamente semeadas em placas de cultura celular de 12 poços, as quais foram transfectadas com os guias, utilizando o reagente FuGENE (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida as células foram mantidas em estufa úmida à 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 horas. Após o tempo de incubação, clones de células fluorescentes foram separados pelo equipamento *FACSMelody* (BD®) e transferidos para

placas de 96 poços, sendo mantidos em meio DMEM-F12 com 10 % de SFB em estufa úmida à 37 °C e 5 % de CO₂ por 10-14 dias para expansão dos clones celulares. Em seguida, as células foram transferidas para placas de 24 poços para a análises fenotípicas por imunofluorescência e *Western blot*.

2.10 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Células A549 foram previamente semeadas em placas de cultura de 10 mm. Em seguida, as células foram transfectadas com 10 µg de cada vetor (NS5-FLAG ou NS5Δ-FLAG) através do reagente FuGENE, seguindo as recomendações do fabricante. Após o tempo de incubação determinado de acordo com o experimento, as células foram transferidas para tubos, seguido de centrifugação à 460 x g por 5 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X gelado, sendo centrifugado em cada lavagem. Na última lavagem, as células foram transferidas para tubos de 1,5 mL e novamente centrifugadas, sendo suspensas em 1 mL de tampão de lise (20 mM de Tris-HCl pH 7.4; 150 mM de NaCl; 10 mM de CaCl₂; 0,1 % de Triton X-100, 10 % de glicerol e inibidor de protease) por 10 min em agitador à 4 °C. O lisado foi centrifugado em 12000 x g por 10 min à 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. O volume de 100 µL foi coletado (fração *input*) de cada amostra. Em seguida, foi adicionado 20 µL de *anti-FLAG®M2 affinity gel* (Sigma®), previamente preparado sob as recomendações do fabricante, e incubado por 16 horas à 4 °C, gentilmente sob agitação constante. Após, as amostras foram centrifugadas em 1000 x g por 30 segundos à 4 °C. O sobrenadante foi coletado (fração *Flow-through [FT]*) e o *pellet* foi lavado quatro vezes com PBS, seguidas de centrifugação em 1000 x g por 30 seg à 4 °C, onde o sobrenadante foi descartado o *pellet* foi suspenso com 100 µL de *3X FLAG peptide* (Sigma®), previamente preparado sob as recomendações do fabricante. Após 30 min de incubação à 4 °C gentilmente sob agitação constante, as amostras foram centrifugadas em 5000 x g por 1 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo (fração imunoprecipitado [IP]). As frações *input*, *FT* e *IP* foram diluídas em tampão SDS-PAGE e desnaturadas à 95 °C por 5 min para posterior análise por *Western blot*.

2.11 CONCATEMERIZAÇÃO DE DNA

Para geração de DNA com dupla fita, usado como um estimulador de interferon (ISD *Interferon-Stimulatory DNA*), foi utilizada a sequência (TACAGATCTACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCTACA), na qual foi fosforilada na porção final 5' através da incubação com *T4 polynucleotide kinase* (New England Biolabs®) por 30 min à 37°C e então ligada com *T4 DNA ligase* (Promega®) por 16 horas à temperatura ambiente. A concatemerização foi confirmada por gel de eletroforese. O ISD foi utilizado na concentração de 10 µg/ml para transfecção nas células.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados através do *software GraphPad Prisma 8*, utilizando *test T* não pareado e *ANOVA* de uma ou duas vias, de acordo com o desenho experimental. A análise estatística foi expressa da seguinte forma: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. As barras representam a média juntamente com o erro padrão da média.

3 RESULTADOS

3.1 GERAÇÃO DE CÉLULAS DEFICIENTES PARA DNA-PKCS

Para estudar o papel do complexo DNA-PK durante infecções por vírus de RNA, células epiteliais de pulmão da linhagem A549 foram utilizadas como modelo *in vitro* por serem suscetíveis à infecção por *Zika virus*, além de produzirem e responderem aos IFN-I. Essa linhagem celular foi selecionada para edição do gene *PRKDC* (gene que codifica para proteína DNA-PKcs, subunidade catalítica do complexo DNA-PK), utilizando a técnica de *CRISPR*, a qual foi utilizada como ferramenta para os experimentos seguintes. A edição do gene *PRKDC* foi realizada na porção N-terminal, região que codifica o sítio de quinase da proteína. Após a transfecção dos guias, foi realizada a separação de clones e posterior avaliação da expressão de DNA-PKcs dos respectivos clones celulares (**Figura 4**). A velocidade de crescimento de alguns clones estava diminuída em comparação com as células controle (WT) (dados não demonstrados), o que dificultaria o estudo nos experimentos posteriores. Por este motivo, esses clones com crescimento lento não foram analisados. Foi observado que a expressão de DNA-PKcs por imunofluorescência, estava presente na maior parte dos clones analisados, porém esta proteína estava ausente nos clones 04, 14 e 35 (**Figura 4**). Este resultado permitiu a exclusão da maioria dos clones que, mesmo após a transfecção, permaneceram expressando a proteína DNA-PKcs.

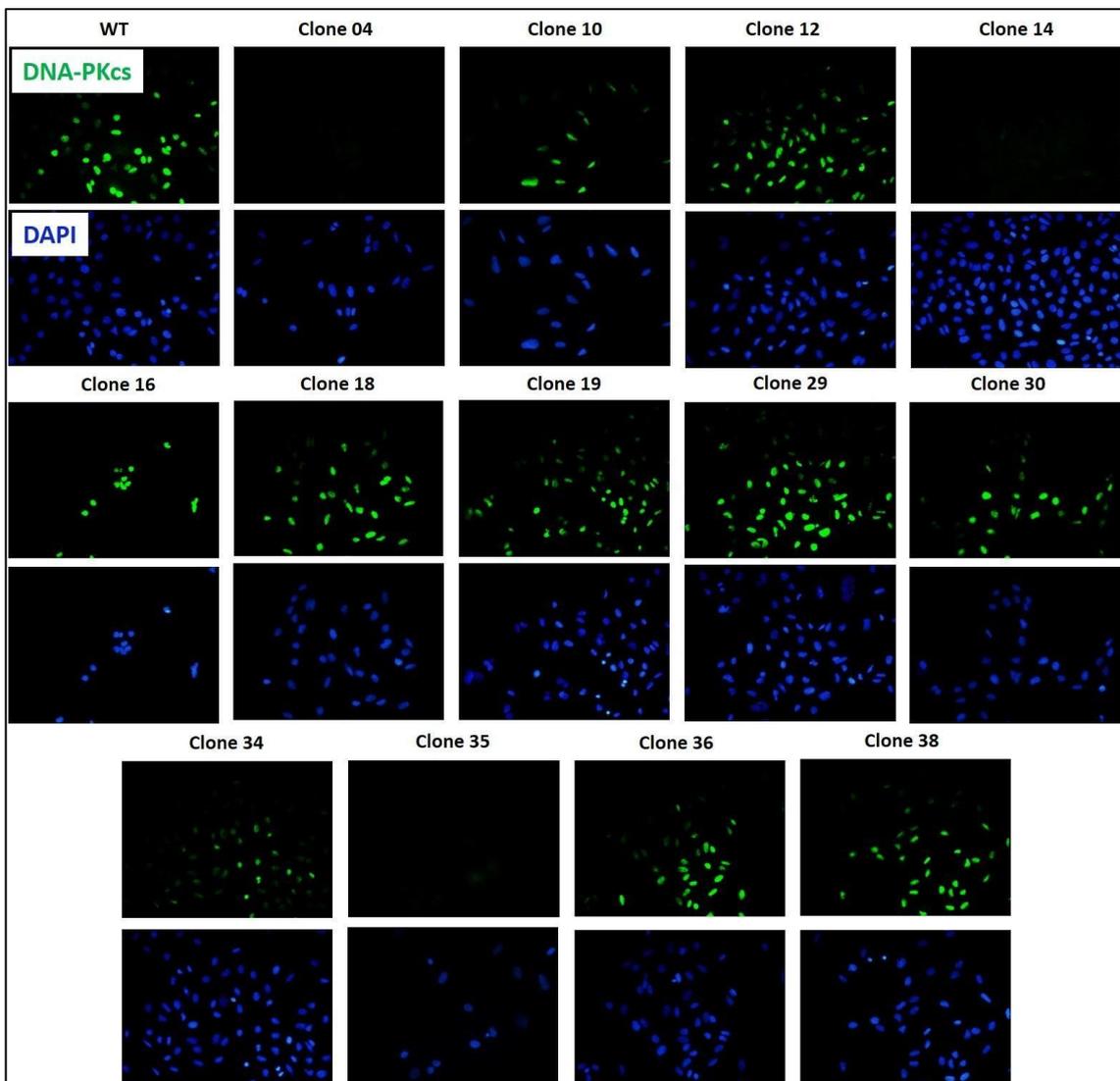


Figura 4. Seleção de clones de células A549 deficientes para DNA-PKcs. Imunofluorescência de clones de células A549 transfectadas com guias para edição do gene *PRKDC*. DNA-PKcs (verde), núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento 20X. WT= célula selvagem.

Os clones 04, 14 e 35 foram selecionados para uma nova análise de expressão proteica, através da técnica de *Western blot* (**Figura 5A**). O resultado demonstra que a expressão de DNA-PKcs dos clones 04 e 35 permanece ausente, já o clone 14 apareceu uma banda fraca, caracterizando a expressão da proteína. Esse resultado sugere que o clone 14 é um heterozigoto e que estas células ainda possuem um alelo expressando a proteína DNA-PKcs, sendo descartado o seu uso. Diante dos resultados, o clone 35 foi selecionado para as próximas análises, as quais tiveram como objetivo confirmar a deficiência de DNA-PKcs. Uma dessas análises foi a repetição da expressão dessa proteína por imunofluorescência (**Figura 5B**), com o resultado permanecendo negativo. A outra análise para confirmar a edição do gene *PRKDC* foi a quantificação relativa do mRNA em comparação com as células selvagens (WT) (**Figura**

5C). O resultado demonstra que a transcrição do gene *PRKDC* foi drasticamente reduzida no clone 35.

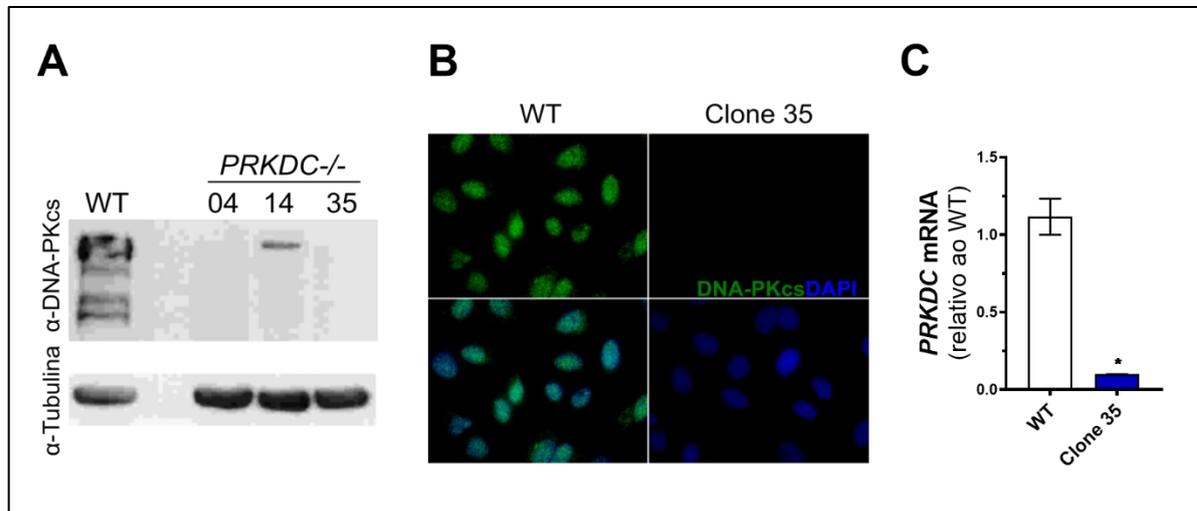


Figura 5. Avaliação da expressão de DNA-PKcs em células A549. **A)** *Western blot* de clones de células A549 deficientes para o gene *PRKDC*. Tamanho esperado: DNA-PKcs: 469 kDa, com bandas adicionais em 230, 180 e 170 kDa; tubulina (controle endógeno): 50 kDa. **B)** Imunofluorescência de células A549 transfectadas com guias para edição do gene *PRKDC* (clone 35). DNA-PKcs (verde), núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento 100X. **C)** Quantificação relativa do mRNA de *PRKDC* em células A549 (WT e clone 35). A quantificação do mRNA de *GAPDH* foi utilizada como controle endógeno. Estatística: *teste t*. WT= célula selvagem. Resultados representativos de um a três experimentos independentes, realizados em monoplicata ou triplicatas técnicas.

O conjunto de resultados demonstra que o clone 35 é uma linhagem de células deficientes para o gene *PRKDC*, o qual não expressa a proteína DNA-PKcs. Desta forma, o clone 35 foi selecionado como uma das ferramentas para avaliação do papel da proteína DNA-PKcs durante a infecção por *Zika virus*. Nas análises posteriores, o clone 35 foi renomeado para célula *PRKDC*^{-/-}.

3.2 AS CÉLULAS *PRKDC*^{-/-} SÃO MAIS SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO POR ZIKV

Com a obtenção das células *PRKDC*^{-/-} e utilizando uma combinação de diferentes técnicas, foi possível avaliar a suscetibilidade dessas células à infecção por ZIKV (**Figura 6**). Para isso, as células *PRKDC*^{-/-} e selvagens (WT) foram infectadas por ZIKV durante diferentes tempos de infecções. Por citometria de fluxo, foi analisada a porcentagem de células infectadas (marcadas com anti-4G2, o qual se liga na proteína E do vírus) (**Figuras 6A e 6B**). Os resultados evidenciaram um aumento da porcentagem de células *PRKDC*^{-/-} infectadas em comparação com as WT a partir do tempo de 12 horas e continua aumentado nos tempos posteriores avaliados. Ainda por citometria de fluxo, também foi mensurada a *intensidade*

mediana de fluorescência (MFI) da proteína E nas células infectadas (**Figuras 6C e 6D**), onde foi evidenciado um aumento do MFI com o passar do tempo, porém não foram observadas diferenças entre as células WT e as células deficientes. Isso sugere que a proteína DNA-PKcs não interfere na quantidade de vírus intracelular. Além disso, foi observado um aumento na liberação de vírus viáveis ao meio extracelular nas células *PRKDC*^{-/-}, quantificado por ensaio de placa (**Figuras 6E e 6F**). Nas **Figuras 6G e 6H**, observa-se pelo ensaio de MTT, uma diminuição da viabilidade nas células *PRKDC*^{-/-} infectadas em comparação com as células WT (a partir de 36 horas em MOI 0,1 e 24 horas em MOI 1). Sugere-se que o aumento da morte celular das *PRKDC*^{-/-} seja devido à maior taxa de infecção. O aumento da infecção nas células deficientes também foi observado através da quantificação do RNA viral, realizado por PCR em tempo real (**Figuras 6I e 6J**). Outra técnica utilizada para analisar o perfil de infecção do vírus foi a imunofluorescência em meio semi-sólido para observação do espalhamento viral às células adjacentes (**Figura 6K**). Foi observado um aumento de 2x na área de infecção, indicando um aumento do espalhamento viral nas células *PRKDC*^{-/-} em comparação com as células controle (**Figura 6L**).

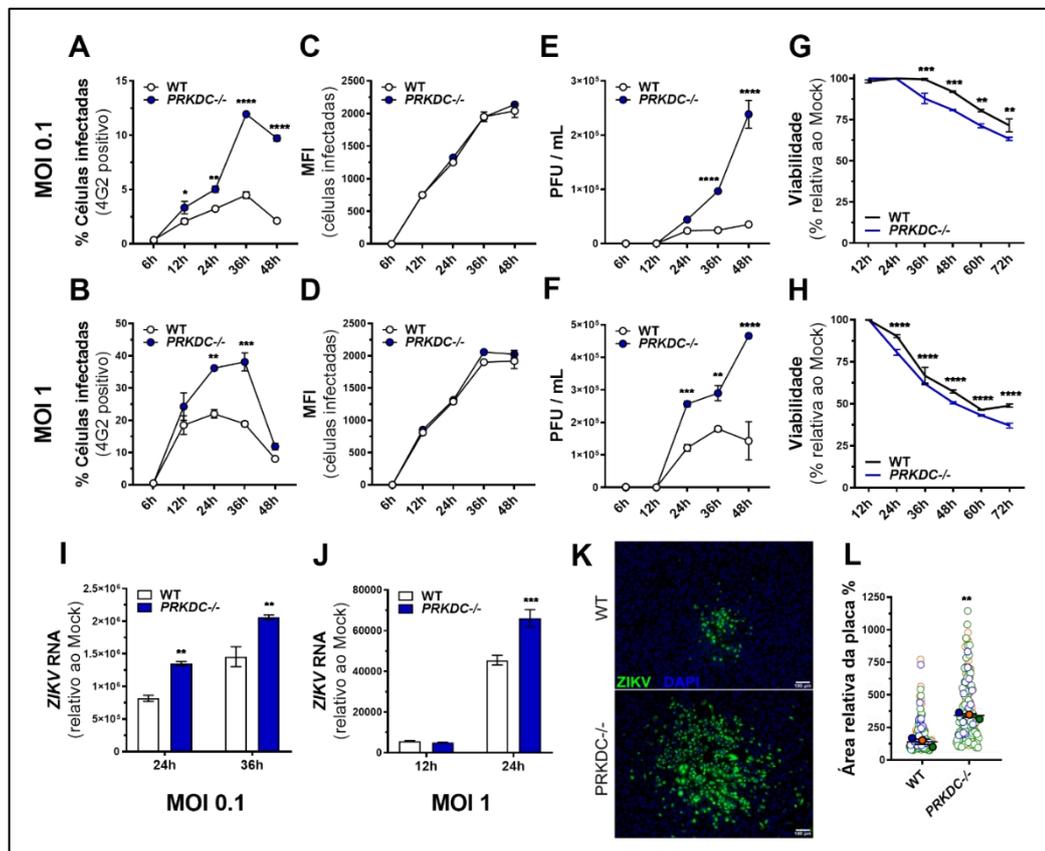


Figura 6. Células *PRKDC*^{-/-} são mais suscetíveis à infecção por ZIKV. A-B) Porcentagem de células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante diferentes tempos de infecção. Estatística: ANOVA de duas vias. C-D) Intensidade da mediana de fluorescência (MFI) de células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas

por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante diferentes tempos de infecção. Estatística: *ANOVA* de duas vias. **E-F**) Titulação de vírus viáveis no meio extracelular de cultura com A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante diferentes tempos de infecção. Estatística: *ANOVA* de duas vias. **G-H**) Ensaio de viabilidade (MTT) em células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante diferentes tempos de infecção. Estatística: *ANOVA* de duas vias. **I-J**) Quantificação relativa de RNA de ZIKV em células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante 12, 24 e 36 horas. A quantificação do mRNA de *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. Estatística: *ANOVA* de duas vias. **K**) Espalhamento viral por imunofluorescência em células A549 infectadas por ZIKV (50 pfu). Proteína E (verde), núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento 20X. **L**) Quantificação relativa da área da placa de infecção observado em **(F)**. Estatística: *teste t*. WT: célula selvagem. Resultados representativos de dois ou três experimentos independentes, realizados em triplicatas técnicas.

Os resultados obtidos nesse conjunto de experimentos demonstram que as células *PRKDC*^{-/-} são mais suscetíveis à infecção por ZIKV em comparação com as células WT, sugerindo que a proteína DNA-PKcs está envolvida no controle dessa infecção.

3.3 REGULAÇÃO DE *SPLICING* ALTERNATIVO E LIGAÇÃO DE DNA-PKCS EM NS5

O complexo DNA-PK possui múltiplas funções, distribuídas em diferentes regiões da célula, sendo que algumas dessas funções ainda não foram completamente elucidadas (YANG et al., 2020). Além disso, as proteínas não-estruturais (NS) do ZIKV são essenciais para o seu ciclo de replicação e também para os diferentes mecanismos de evasão que este vírus exerce contra as vias antivirais das células hospedeiras (MASMEJAN et al., 2020). Ao levar em consideração essas observações, foram analisadas diferentes vias que conectam o complexo DNA-PK com o ZIKV e que poderiam ser responsáveis pelo aumento da suscetibilidade das células *PRKDC*^{-/-}.

O complexo DNA-PK localiza-se majoritariamente no núcleo celular, onde exerce sua principal função no reparo de dano de DNA, além de outras funções como na regulação do metabolismo de RNA, por exemplo, no processo de *splicing* alternativo (LIU et al., 2019; SHAO et al., 2020). Por outro lado, durante o ciclo de replicação do ZIKV a proteína não-estrutural NS5 exerce outras funções no núcleo, dentre elas, a regulação do *splicing* alternativo de mRNA. Observa-se nesses estudos que o *splicing* alternativo do gene SRSF1 parece ser alvo de ambos DNA-PK e NS5 (KOVANICH et al., 2019; LIU et al., 2019). Por este motivo, foi avaliado o *splicing* alternativo de SRSF1 (SRSF1-AS) utilizando uma sequência conservada em ambos os isômeros como controle endógeno, onde as células WT e *PRKDC*^{-/-} foram infectadas por ZIKV (**Figura 7**). Na **Figura 7A** observa-se que a transcrição basal de SRSF1-AS em *PRKDC*^{-/-} está diminuída em relação ao WT. No entanto a infecção por ZIKV aumentou

o *splicing* alternativo na mesma proporção em ambas as células no tempo de 24 horas, quando comparadas com as células não infectadas (*mock*) de cada grupo (**Figura 7B**).

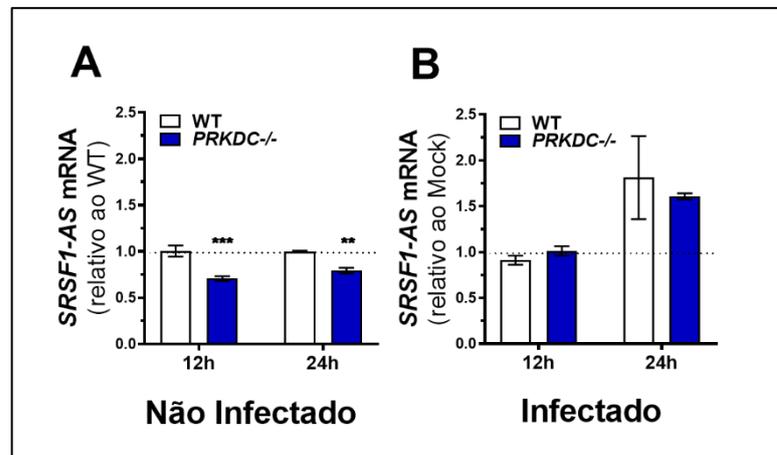


Figura 7. DNA-PKcs e ZIKV estão envolvidos no controle de *splicing* alternativo de SRSF1. **A)** A quantificação relativa do exon relativo ao *splicing* alternativo do mRNA de *SRSF1* (SRSF1-AS) em células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) utilizando primers específicos. As reações foram normalizadas utilizando primers para o exon 1 do mRNA de *SRSF1*, o qual é conservado entre os isômeros. Estatística: *ANOVA* de duas vias. **B)** Quantificação relativa do mRNA de SRSF1-AS, como indicado em (A), em células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 1) durante 12 e 24 horas. Estatística: *ANOVA* de duas vias. WT: célula selvagem. Resultados dos representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicatas técnicas.

Os resultados demonstram que ambos DNA-PKcs e ZIKV regulam o *splicing* alternativo de SRSF1. No entanto, o fenótipo encontrado durante a infecção não parece estar associado com o aumento da suscetibilidade das células *PRKDC*^{-/-}.

A próxima hipótese foi que o mecanismo de ação de DNA-PKcs no controle da infecção está associado com a ligação direta à proteína NS5 no núcleo. Para testar esta hipótese, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação, utilizando um vetor NS5 contendo uma cauda FLAG (NS5), além de outro vetor contendo NS5 mutante com FLAG (NS5Δ), incapaz de translocar para o núcleo. As células A549 WT foram transfectadas com os vetores mencionados, sendo posteriormente incubadas por 8 e 24 horas (**Figura 8**). Dentre os tempos analisados, os resultados evidenciam que a expressão de NS5 ocorre apenas no tempo de 24 horas (*Input* e *IP*), não sendo observada expressão no tempo de 8 horas. No entanto observa-se que a proteína DNA-PKcs não se liga na proteína NS5 nas condições avaliadas.

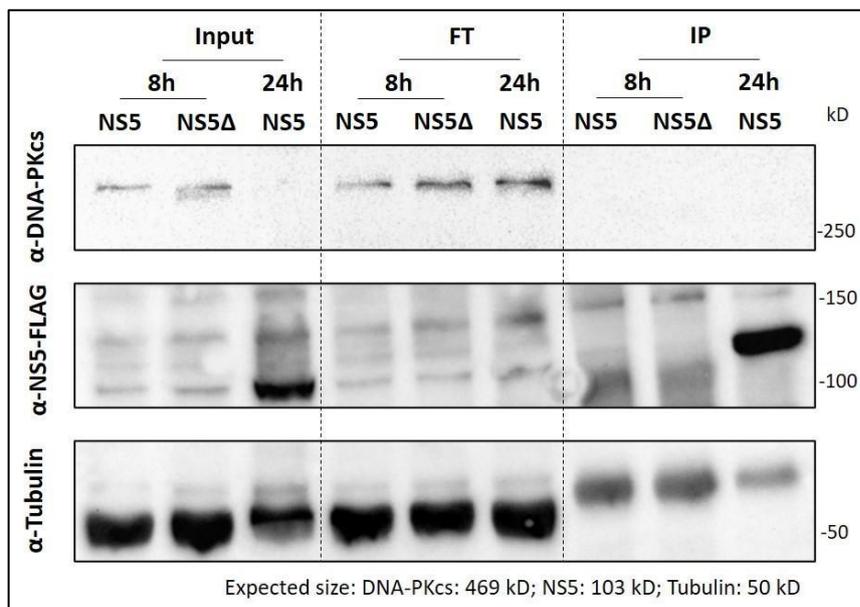


Figura 8. Ausência de ligação entre DNA-PKcs e NS5. Extrato proteico total extraído de células A549 transfectadas com NS5-FLAG por 8 e 24 horas ou com NS5Δ-FLAG por 8 horas (*Input*). Esses extratos proteicos foram utilizados para imunoprecipitação com FLAG, no qual foram separadas entre as proteínas não ligadas em FLAG (*FT*) e as proteínas complexadas com FLAG (*IP*). *Western blot* para as proteínas DNA-PK (tamanho esperado: 469 kDa); FLAG-NS5 (tamanho esperado: 103 kDa); e o controle endógeno Tubulina (tamanho esperado: 50 kDa).

Com esses resultados, sugere-se que a contribuição da proteína DNA-PKcs na resposta antiviral não está envolvida com a proteína NS5 de ZIKV.

3.4 DNA-PKcs REGULA A EXPRESSÃO DE INTERFERON LAMBDA 1 DURANTE A INFECÇÃO POR ZIKV

Durante infecções por vírus com genoma de DNA, o complexo DNA-PK tem a função como sensor de DNA. A ativação da via dos sensores de DNA leva à transcrição dos *interferons do tipo I* (IFN-I), cuja principal função é a indução de centenas de *genes estimulados por IFN* (ISG) (TEIJARO, 2016). Contudo, essa função do complexo DNA-PK não é ativada através da indução por RNA sintético (Poli I:C) e ainda, poucos trabalhos relacionam esse complexo com a via dos IFN-I durante infecções por vírus de RNA (FERGUSON et al., 2012; VETTER et al., 2012). Dessa forma, mesmo o ZIKV sendo um vírus com genoma de RNA, foi avaliado se a infecção ativa a via dos IFN-I de maneira dependente do complexo DNA-PK.

Assim, foi analisada a transcrição de IFN- β (*IFNB*) e também a transcrição de alguns ISGs ativados por IFN, através da quantificação dos mRNAs das células WT e *PRKDC*^{-/-} infectadas por ZIKV. Os resultados demonstram que a transcrição de *IFNB* não é afetada na

ausência de DNA-PKcs (**Figuras 9A e 9B**). Dentre os ISGs analisados, não foi observada nenhuma modulação nas transcrições comparadas com o WT (**Figuras 9C-F**), com exceção de *IFIT2*, o qual foi observada uma diminuição em sua transcrição nas células *PRKDC*^{-/-} (**Figuras 9G e 9H**). Também foi analisada a expressão proteica de IFIT3. No entanto, não foi observado diferença entre os grupos, assim como sua transcrição (**Figuras 9I e 9J**)

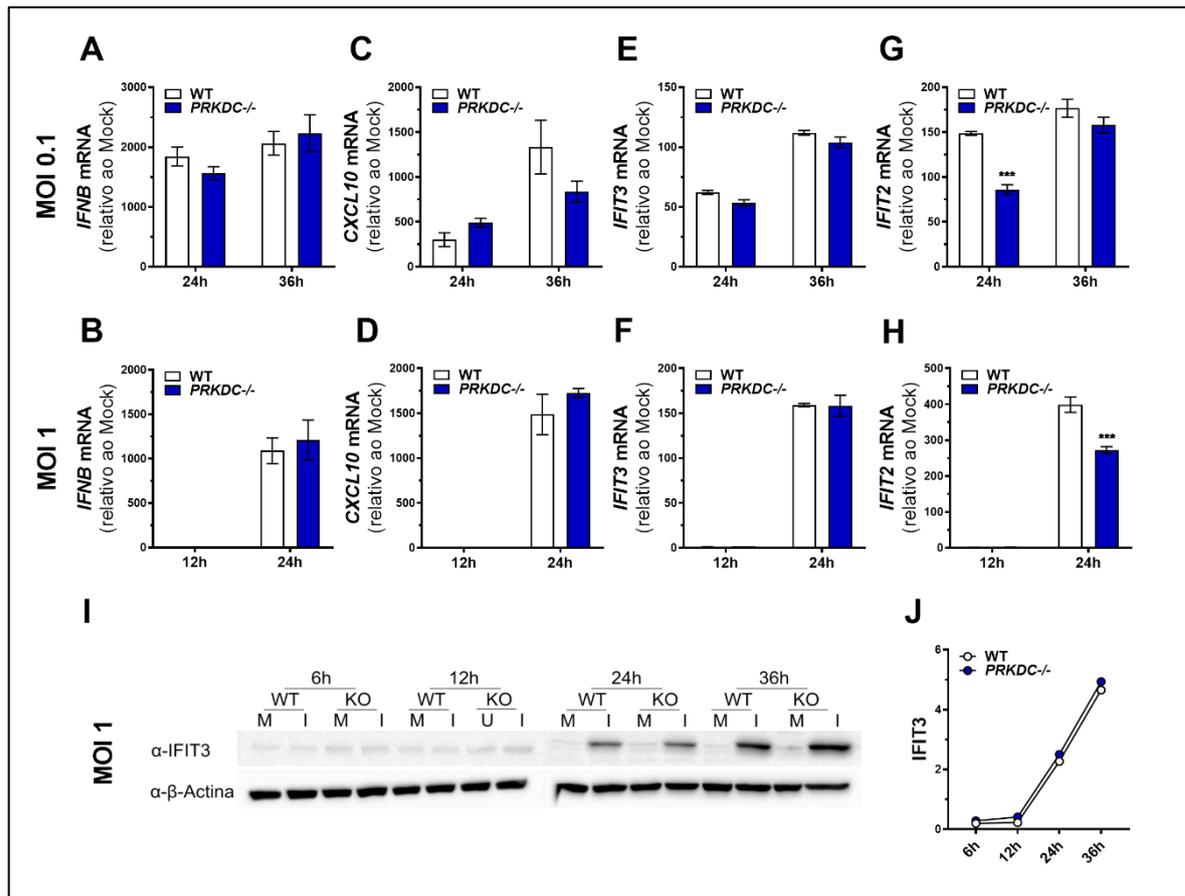


Figura 9. A atividade de DNA-PKcs durante a infecção por ZIKV ocorre de maneira independente de IFN-I. A-H) Células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante diferentes tempos de infecção. Quantificação relativa de mRNA de *IFNB* (A-B), *CXCL10* (C-D), *IFIT3* (E-F) e *IFIT2* (H-I). A quantificação do mRNA de *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. Estatística: ANOVA de duas vias. **I)** Western blot para expressão de IFIT3 em células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectada por ZIKV (MOI 1) durante os tempos entre 6 e 36 horas. A expressão de β -Actina foi utilizada como controle endógeno. **J)** Quantificação relativa do produto amplificado em (I), utilizando a amplificação de β -actina como controle endógeno. WT: Selvagem; KO: *PRKDC*^{-/-}; M: Não infectado (Mock); I: Infectado. Resultados representativos de um a três experimentos independentes, utilizando monoplicata (I-J) ou triplicatas técnicas (A-H).

O conjunto de resultados sugere que a ativação da via dos IFN-I ocorre de maneira independente de DNA-PKcs durante a infecção por ZIKV. Entretanto, a diminuição na transcrição de *IFIT2* pode estar relacionada, direta ou indiretamente, com a presença de DNA-PKcs.

Além da via dos IFN-I, infecções virais também induzem via dos *interferons do tipo III* (IFN-III), o qual também induz a expressão de ISGs. Dessa forma, sugere-se que a alteração na transcrição do *IFIT2* observada na **Figura 10G-H**, pode estar associada com a regulação da via do IFN-III pelo complexo DNA-PK. Assim, foi analisado a transcrição de IFN- λ 1 pertencente à família dos IFN-III (**Figura 10A e 10B**). Os resultados demonstram que durante a infecção por ZIKV, a transcrição de *IFNL1* está diminuída nas células *PRKDC*^{-/-}. Além disso, também foi analisada a transcrição de *NFKBIA* (**Figura 10C**), subunidade inibitória do fator de transcrição NF- κ B, o qual está associado com indução de citocinas inflamatórias e também se liga na região promotora dos IFN-I e IFN-III. Porém, as células infectadas não apresentam diferença na transcrição de *NFKBIA* entre WT e *PRKDC*^{-/-} nos tempos analisados.

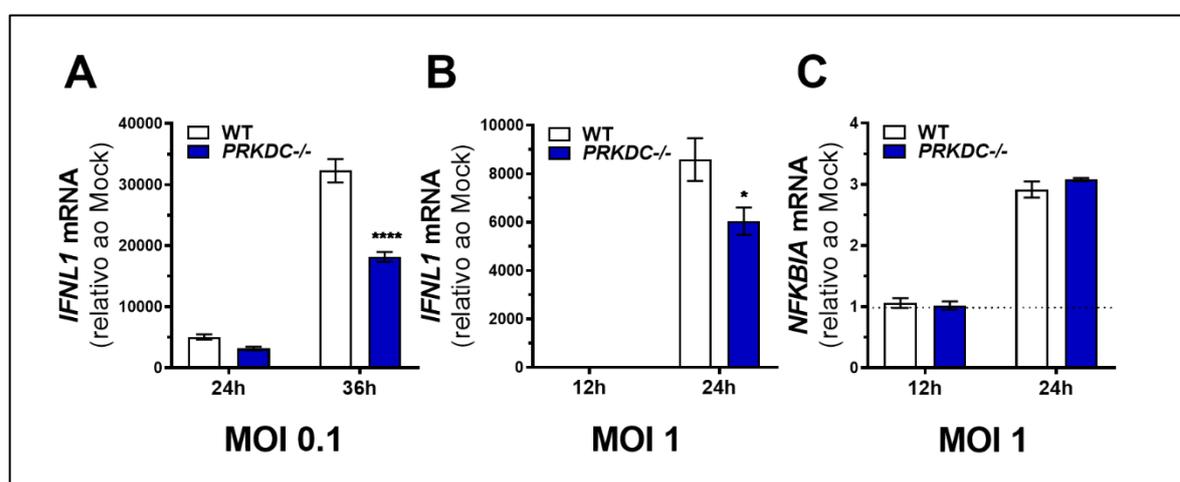


Figura 10. DNA-PKcs regulação da via dos IFN-III durante a infecção por ZIKV. Células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1 e 1) durante diferentes tempos de infecção. Quantificação relativa do mRNA de *IFNL1* (A-B) e *NFKBIA* (C). A quantificação do mRNA de *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. Estatística: ANOVA de duas vias. Resultados representativos de dois ou três experimentos independentes, realizados em triplicatas técnicas.

Dessa forma, os resultados sugerem que durante a infecção por ZIKV, o complexo DNA-PK contribui para a indução da expressão de IFN- λ 1, e possivelmente a regulação da expressão desse IFN-III pode estar associada com a menor expressão de *IFIT2*, observada na **Figura 9G e 9H**.

Com objetivo de avaliar a função quinase da proteína DNA-PKcs na infectividade de ZIKV e no perfil de expressão de IFN- β e IFN- λ 1, foi utilizado o inibidor de DNA-PKcs chamado NU7441. A citotoxicidade do inibidor NU7441 foi analisada por ensaio de MTT durante 36 horas e foi observada uma diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de 3 μ M (**Figura 11A**). Em outro set de experimentos as células foram pré-incubadas por 1

hora com NU7441 e então, infectadas por ZIKV em meio contendo o inibidor. Foi observado que 1 μM de NU7441 aumentou a suscetibilidade das células WT à infecção para valores próximos ao observado nas células *PRKDC*^{-/-} não tratadas. Como esperado, a mesma concentração não aumentou a infecção nas células *PRKDC*^{-/-}. Entretanto, a concentração de 3 μM foi suficiente para aumentar a infecção em ambas as células (WT e *PRKDC*^{-/-}) (**Figura 11B**).

A concentração de 1 μM de NU7441 foi utilizada para analisar a transcrição de IFN- β , IFN- $\lambda 1$ e IFIT2 (**Figura 11C-E**). Para isso, as células infectadas por ZIKV foram pré-incubadas por 1 hora com NU7441 e então, infectadas por 24 horas com ZIKV em meio contendo o inibidor. Os resultados demonstram que o inibidor de DNA-PKcs não regula a transcrição de *IFNB*, mas bloqueia parcialmente a transcrição de *IFNL1* nas células WT em comparação ao grupo não tratado. Além disso, como demonstrado anteriormente, a transcrição de *IFNL1* e *IFIT2* foram menores nas células *PRKDC*^{-/-} em comparação com as células WT e como esperado, o inibidor não apresentou efeito nas células *PRKDC*^{-/-}. No entanto, curiosamente o NU7441 induziu um aumento da expressão de *IFIT2* nas células WT.

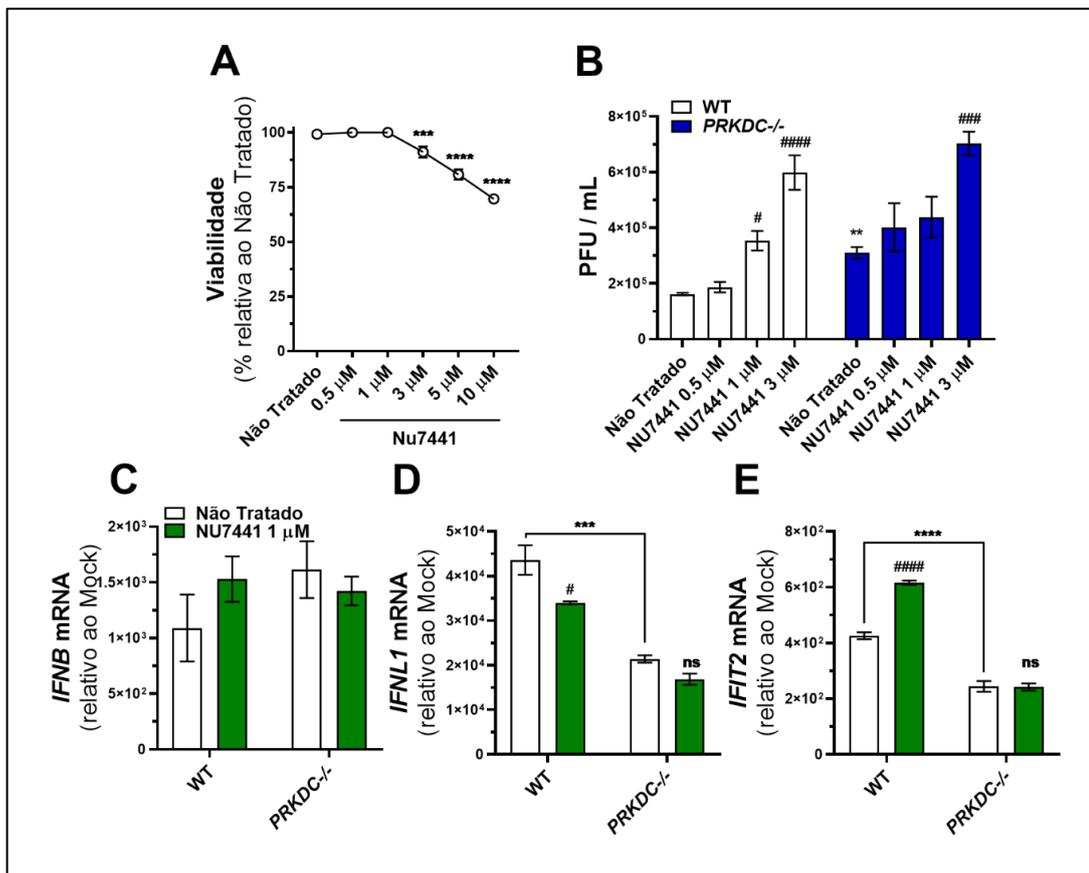


Figura 11. A inibição de DNA-PKcs aumenta a infecção por ZIKV e regula a expressão de *IFNL1*. A) Ensaio de viabilidade (MTT) em células A549 tratadas com o inibidor NU7441 em diferentes concentrações, durante 36

horas. Estatística: *ANOVA* de uma via. **B)** Titulação de vírus viáveis no meio extracelular de cultura com A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 1) e tratadas com diferentes concentrações do inibidor NU7441, durante 24 horas de infecção. Estatística: *ANOVA* de duas vias. **(C-E)** Células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 1) e tratadas com NU7441 (1 µM) durante 24 horas de infecção. Quantificação relativa do mRNA de *IFNB* (**A**), *IFNLI* (**B**) e *IFIT2* (**C**). O mRNA de *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. Estatística: *ANOVA* de duas vias. WT: Célula selvagem. Resultados representativos de dois ou três experimentos independentes, realizados em triplicatas técnicas. WT: Célula selvagem. *Comparação relativa ao WT; #Comparação relativa ao grupo Não Tratado.

O conjunto de resultados demonstra que o bloqueio farmacológico da função quinase de DNA-PKcs aumenta a suscetibilidade à infecção por ZIKV e diminui a expressão de IFN-λ1, sugerindo que o mecanismo de ação de DNA-PKcs para o controle da infecção é dependente da sua função quinase. Entretanto, efeitos observados em maiores concentrações do NU7441 nas células *PRKDC*^{-/-} sugerem que o inibidor possui mecanismos secundários à inibição de DNA-PKcs.

A transcrição de *IFNLI* ocorre, principalmente, através da ativação de IRF3 e IRF7, mas a mesma também pode ser induzida por IRF1 (DOU et al., 2014; PANDA et al., 2019). Esses fatores de transcrição localizam-se no citoplasma e após ativadas, translocam-se para o núcleo, onde ocorre a indução da expressão dos IFNs. Dessa forma, a diminuição da expressão de IFN-λ1 observada nas células *PRKDC*^{-/-} durante a infecção por ZIKV pode estar associada com a regulação da translocação dos fatores de transcrição mencionados. Por isso, foi analisada a taxa de translocação de IRF1, IRF3, IRF7 nas células WT e *PRKDC*^{-/-} infectadas por ZIKV (**Figura 12**). Os resultados demonstraram que a translocação de IRF3 (**Figuras 12A e 12B**) e IRF1 (**Figuras 12E e 12F**) ocorreram de maneira independente de DNA-PKcs. Todavia, não foi observado translocação de IRF7 nas células durante a infecção por ZIKV (**Figura 12C**). Como alternativa, foi mensurada a transcrição de *IRF7* nas mesmas condições de infecção, não sendo observada diferença entre as células analisadas.

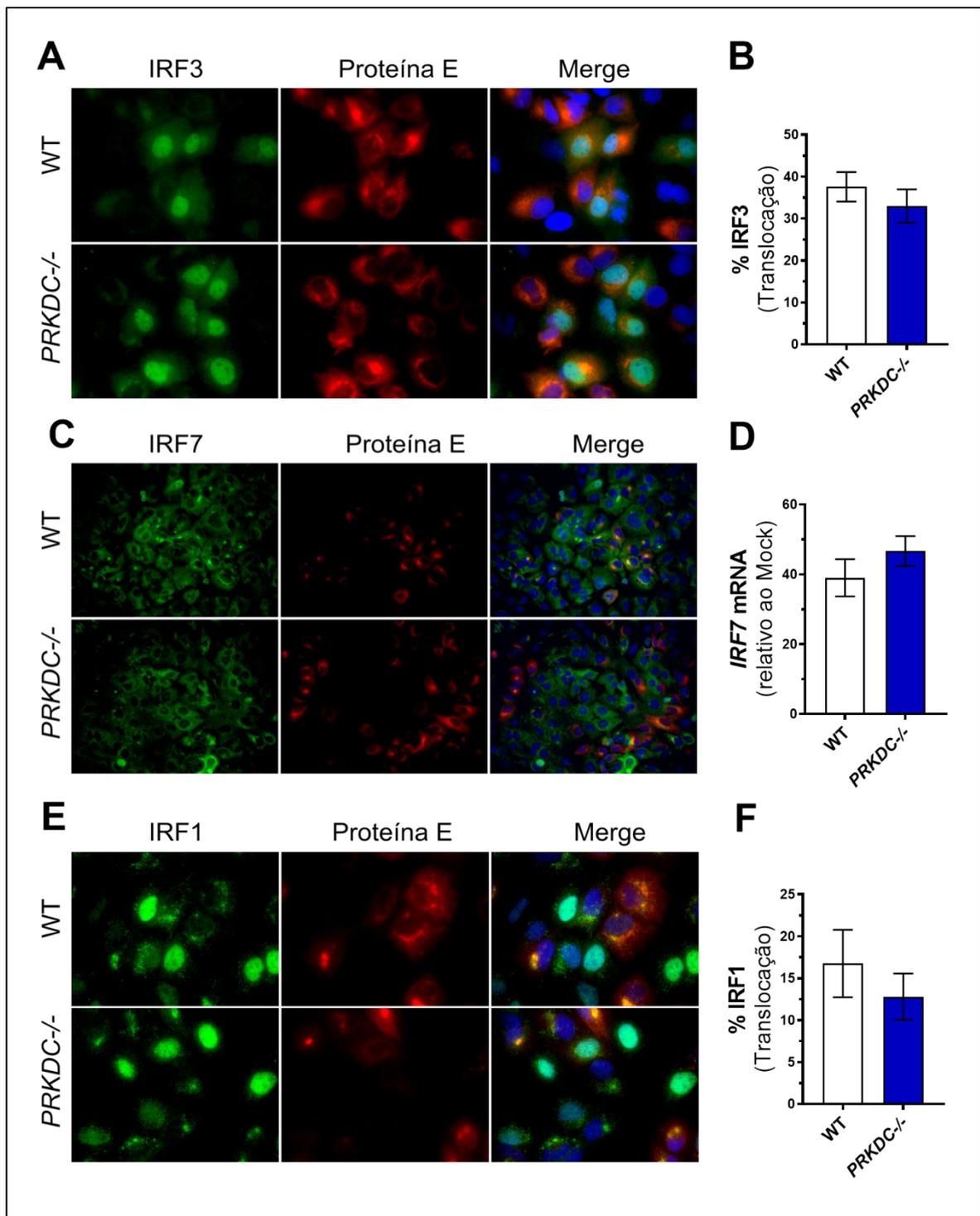


Figura 12. Atividade de DNA-PKcs independente da translocação nuclear de IRF1, IRF3 e IRF7 durante infecção por ZIKV. A-F Células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1) durante 36 horas. **A)** Localização de IRF3 endógeno por imunofluorescência. IRF3 (verde); Proteína E (vermelho); Núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento: 100X. **B)** Quantificação relativa de células com marcação nuclear em **(A)**, analisadas em imagens retiradas de campos aleatórios da lâmina. Estatística: *teste t*. **C)** Localização de IRF7 endógeno por imunofluorescência. IRF7 (verde); Proteína E (vermelho); Núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento: 20X. **D)** Quantificação relativa do mRNA de IRF7, utilizando o mRNA de GAPDH como controle endógeno. Estatística: *teste t*. **E)** Localização de IRF1 endógeno por imunofluorescência. IRF1 (verde); Proteína E (vermelho); Núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento: 100X ou 40X. **F)** Quantificação relativa de células com marcação nuclear

em **(E)**, analisadas em imagens retiradas de campos aleatórios da lâmina. Estatística: *teste t*. WT: Célula selvagem; *Merge* (sobreposição das imagens). Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Esses resultados sugerem que durante a infecção por ZIKV, as translocações citoplasma/núcleo de IRF1 e IRF3 ocorrem de maneira independente de DNA-PKcs, além de que essa infecção não induz a translocação de IRF7.

Ao analisar a translocação de IRF1 (**Figura 12E**), foi observado que as células em que há translocação eram as células não infectadas (*bystander*), frequentemente adjacentes às placas de infecção. Sabendo que a expressão da proteína E de ZIKV é detectável por imunofluorescência somente após 12 horas de infecção (dados não demonstrados), sugere-se que a translocação de IRF1 pode estar ocorrendo em células em estágios iniciais de infecção. Para confirmar se a translocação de IRF1 do citoplasma para o núcleo ocorre apenas nas células *bystander* e se DNA-PKcs regula a dinâmica dessa translocação, foi realizada uma nova infecção com ZIKV nas células WT e *PRKDC*^{-/-}, marcando as células infectadas pela dupla fita de RNA (dsRNA), cuja presença ocorre nas primeiras horas de infecção (**Figura 13A**). Além disso, também foi analisada a translocação do fator de transcrição IRF5, pois esse fator também pode regular a expressão dos IFNs (**Figura 13B**). Os resultados demonstraram que as células WT e *PRKDC*^{-/-} apresentaram translocações de IRF1 apenas nos grupos infectados e em células *bystander* de maneira semelhante. Além disso, não foi observado translocação de IRF5 do citoplasma para o núcleo durante a infecção por ZIKV.

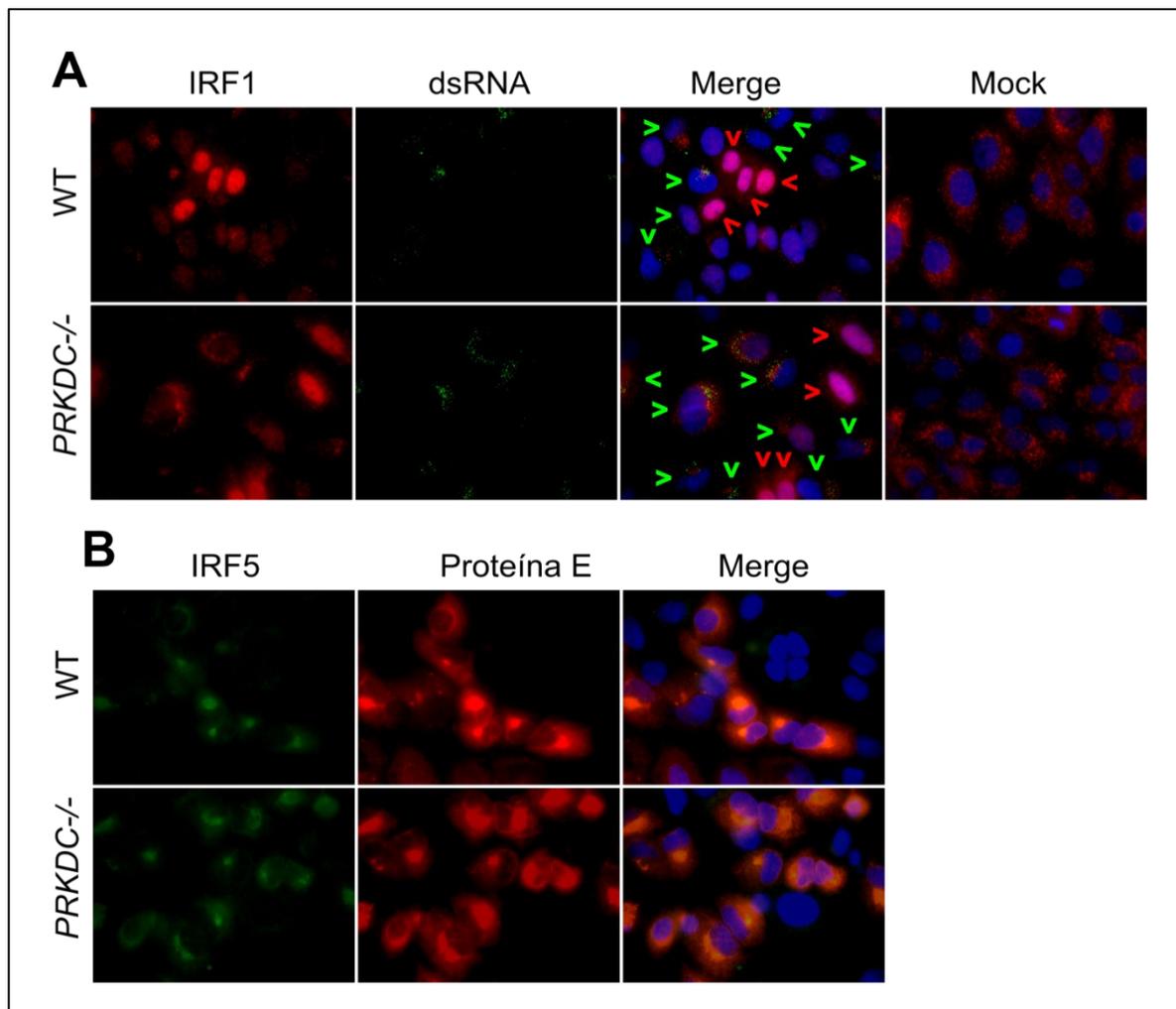


Figura 13. Atividade de DNA-PKcs independente da translocação nuclear de IRF1 e IRF5 durante infecção por ZIKV. A-B) Células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 0,1) durante 36 horas. **A)** Localização de IRF1 endógeno por imunofluorescência. IRF1 (vermelho); dsRNA (verde); Núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento: 100X. **B)** Localização de IRF5 endógeno por imunofluorescência. IRF5 (verde); Proteína E (vermelho); Núcleo marcado com DAPI (azul). Células infectadas (seta verde); Translocação de IRF1 (seta vermelha). Aumento: 100X. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Os resultados sugerem que as células *bystander* são ativadas pelas células infectadas, as quais induzem a translocação de IRF1 do citoplasma para o núcleo, sendo que esse fenótipo acontece de maneira independente de DNA-PKcs. Além disso, durante a infecção por ZIKV, não há translocação de IRF5 do citoplasma para o núcleo.

O conjunto de resultados sugere que, durante a infecção por ZIKV, a proteína quinase DNA-PKcs é ativada, impulsionando a expressão de IFN- λ 1 e aumentando a expressão de ISGs com funções inibitórias da replicação viral. Sugere-se que o mecanismo de ação da DNA-PKcs nesse modelo ocorre após a translocação dos fatores de transcrição para o núcleo.

3.5 ATIVIDADE DE DNA-PKCS INDEPENDENTE DA VIA DOS SENSORES DE DNA

A ativação do complexo DNA-PK ocorre após sua ligação em DNA de origem nuclear ou viral (FERGUSON et al., 2012; GU et al., 1997; NUSSENZWEIG et al., 1996). No entanto, a importância desse complexo na transdução de sinal das vias dos sensores de RNA ou DNA durante a infecção por um vírus com genoma de RNA, como o ZIKV, está pouco elucidada. Para investigar esse contexto, as células A549 foram transfectadas com DNA sintético (ISD), DNA purificado (CT-DNA) ou com RNA sintético (Poli I:C), nos quais foram avaliados a transcrição de IFN- β e do ISG CXCL10 (**Figura 14**). Foi observado que os estímulos com DNA não induziram a transcrição de *IFNB* e *CXCL10*, porém foi observado um aumento sob estímulo de Poli I:C. A falta de resposta das células A549 ao estímulo por DNA sugere que essa célula não responde ao DNA exógeno, havendo a necessidade de experimentos adicionais para confirmar essa observação.

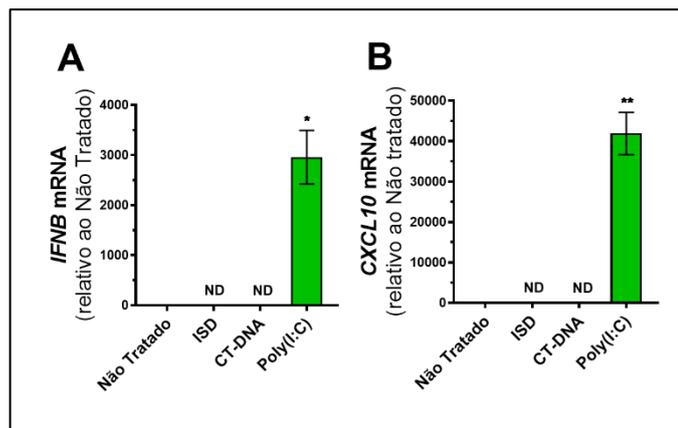


Figura 14. Células A549 são resistentes ao estímulo com DNA exógeno. A-B) Células A549 transfectadas com 10 μ g de DNA sintético (ISD), 10 μ g de DNA purificado (CT-DNA) ou 10 μ g de RNA sintético (Poli I:C) durante 6 horas. Quantificação relativa do mRNA de *IFNB* (A) e *CXCL10* (B). A quantificação do mRNA de *GAPDH* foi utilizada como controle endógeno. Estatística: ANOVA de uma via. Resultados representativos de dois experimentos independentes, utilizando triplicatas técnicas.

Outra fonte de DNA capaz de ativar DNA-PKcs é o DNA derivado de dano nuclear. Baseado nisso, foi analisado a capacidade do ZIKV em induzir quebra na dupla fita de DNA (DSB – *Double strand DNA break*), através da marcação da histona γ H2A.X fosforilada (**Figura 15**). Para isso, as células WT e *PRKDC*^{-/-} foram infectadas por ZIKV ou tratadas com etoposídeo (inibidor de topoisomerase 2), um indutor de DSB. Além disso, as células WT também foram pré- e pós-tratadas com NU7441 sob as mesmas condições. Como esperado, o tratamento com etoposídeo aumentou o número de células com DSB e o número de foco de

γ H2A.X por célula em comparação com as células sem tratamento (*Mock*), sendo este efeito potencializado nas células *PRKDC*^{-/-} e nas células tratadas com o inibidor NU7441 (**Figura 15A-C**). Já a infecção por ZIKV não foi capaz de aumentar o número de células com DSB (**Figura 15A e 15B**) ou o número de focos de γ H2A.X por célula (**Figura 15A e 15C**). Ainda, foi observado um aumento na porcentagem de células com DSB no grupo *PRKDC*^{-/-} em comparação com WT (**Figura 15A e 15B**).

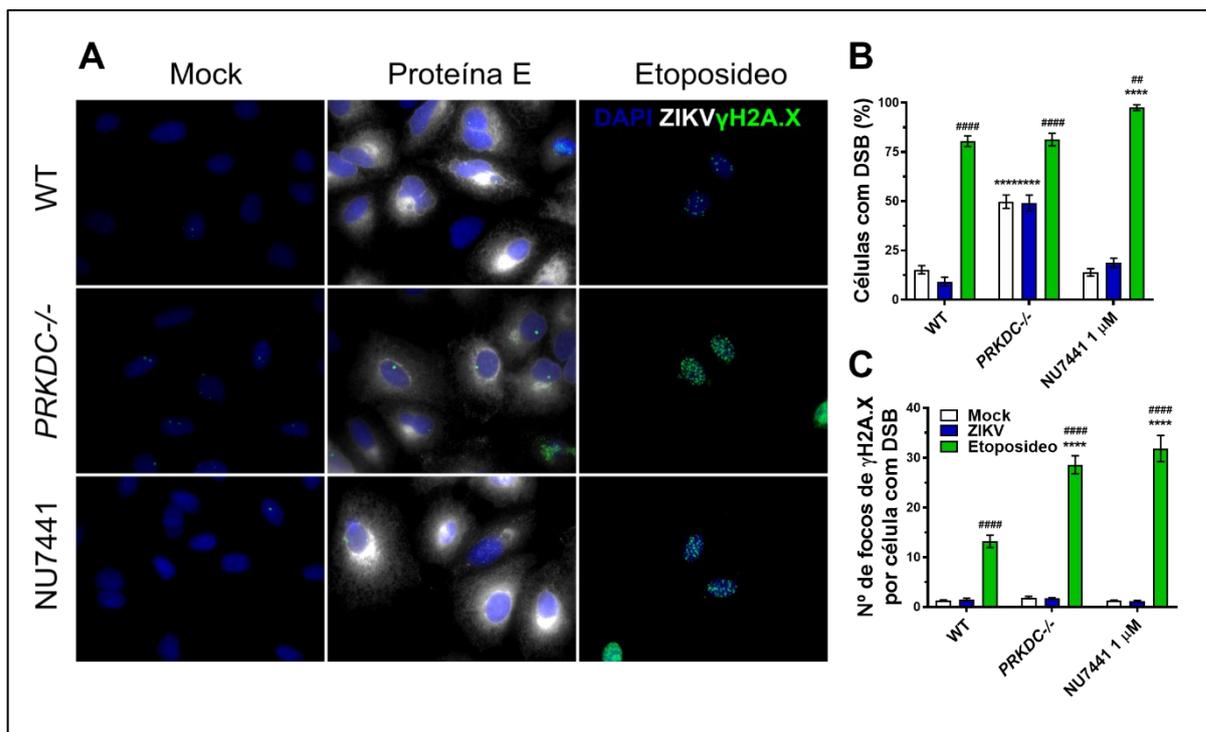


Figura 15. ZIKV não induz dano de DNA em células A549. A) Localização de γ H2A.X em células A549 (WT e *PRKDC*^{-/-}) infectadas com ZIKV (MOI 0,1) ou tratadas com 1 μ M do inibidor NU7441 (apenas células WT), durante 36 horas de infecção. O tratamento com 3 μ M de etoposídeo foi utilizado como controle positivo de dano de DNA. Núcleo marcado com DAPI (azul); γ H2A.X (focos verdes); Proteína E (cinza). B) Quantificação relativa de células com focos de γ H2A.X em (A), representando células com quebra na dupla fita de DNA (DSB). Quantificação analisada em imagens retiradas de campos aleatórios da lâmina. Estatística: ANOVA de duas vias. C) Quantificação relativa do número de focos de γ H2A.X por célula com DSB em (A). Quantificação analisada em imagens retiradas de campos aleatórios da lâmina. Esta estatística: ANOVA de duas vias. Resultados representativos de dois experimentos independentes. WT: Célula selvagem; *Mock*: Não tratado e não infectado. *Comparação relativa ao WT; #Comparação relativa ao *Mock*.

O conjunto de resultados demonstra que ZIKV não induz DSB em células A549, sugerindo que a ativação de DNA-PKcs durante a infecção por ZIKV ocorre por uma via independente de dano nuclear.

Para compreender a importância da via dos sensores de DNA durante a infecção por ZIKV, foi analisada a via canônica de indução de IFN-I e IFN-III através da via dos sensores de RNA. Para essa análise, foram utilizadas células deficientes para o sensor de RNA RIG-I (*RIG-I*^{-/-}), além de células deficientes para TBK1 (*TBK1*^{-/-}), IKK ϵ (*IKKE*^{-/-}) e duplo deficiente

para TBK1 e IKK ϵ (*TBK1/IKKE*^{-/-}). As células foram infectadas por ZIKV e posteriormente foram analisados os mRNAs de IFN- β (**Figura 16A**), IFN- λ 1 (**Figura 16B**) e IFIT2 (**Figuras 16C**). A expressão dos genes analisados foi completamente bloqueada nas células *RIG-I*^{-/-} e *TBK1/IKKE*^{-/-}. Esse bloqueio não foi observado nas células *TBK1*^{-/-} ou *IKKE*^{-/-}, porém, foi observado uma inibição parcial de *IFIT2* nas células *TBK1*^{-/-}.

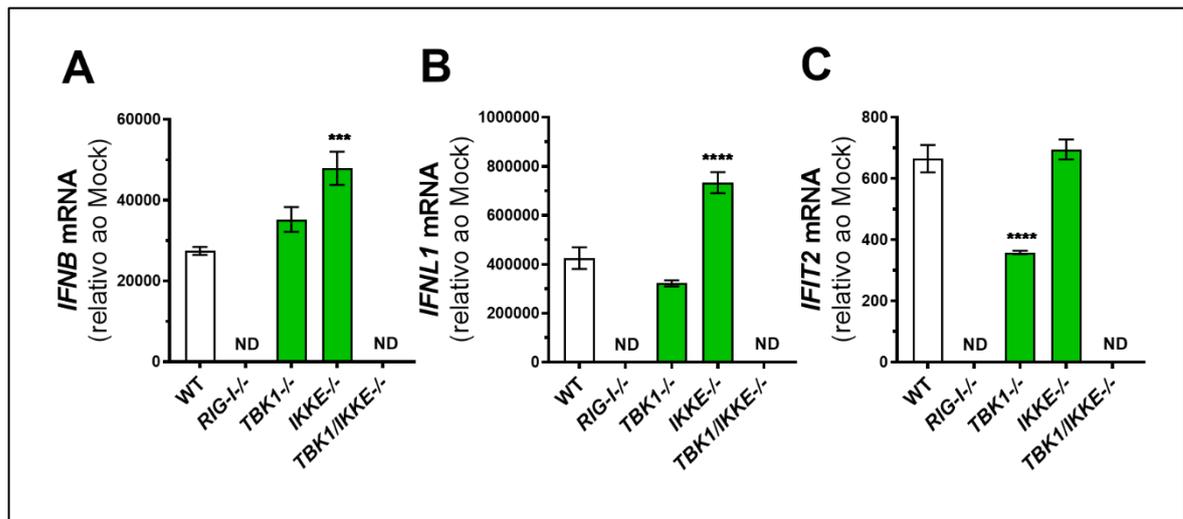


Figura 16. A via dos sensores de RNA é essencial para a expressão de IFN-I e IFN-III durante a infecção por ZIKV. Células A549 (WT, *RIG-I*^{-/-}, *TBK1*^{-/-}, *IKKE*^{-/-} e *TBK1/IKKE*^{-/-}) infectadas por ZIKV (MOI 1) durante 24 horas. Quantificação relativa do mRNA de *IFNB* (A), *IFNL1* (B) e *IFIT2* (C). A quantificação do mRNA de *GAPDH* foi utilizada como controle endógeno. Estatística: ANOVA de uma via. Resultados representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicata s técnicas.

Esse conjunto de resultados sugere que a indução dos IFN-I e IFN-III durante a infecção por ZIKV ocorre de maneira exclusiva através do sensor de RNA RIG-I. Além disso, o complexo TBK1/IKK ϵ também é essencial para a indução dos IFNs. Sugere-se que DNA-PKcs atua no controle da infecção por *ZIKV* de maneira independente da sua função como sensor de DNA.

4 DISCUSSÃO

As células humanas possuem mecanismos de defesa eficientes contra infecções por múltiplos microrganismos, sendo que a principal resposta celular contra infecções virais ocorre pela produção dos IFN-I e IFN-III. Através de vias de sinalização bem definidas e elucidadas, esses IFNs induzem a expressão dos ISGs, um arsenal proteico com múltiplos mecanismos antivirais. A indução da expressão dos IFN-I e IFN-III ocorre pelas mesmas vias canônicas, as quais são definidas por duas vias distintas que reconhecem RNA ou DNA viral, mas que convergem na ativação da quinase TBK1 e posterior ativação dos fatores de transcrição IRF3, IRF7 e IRF1, responsáveis pela expressão dos IFNs (LAZEAR; SCHOGGINS; DIAMOND, 2019). Apesar de bem caracterizadas, as vias de sinalização dos sensores de RNA e DNA ainda carecem de informações para o total entendimento das suas dinâmicas de sinalização. Neste conjunto de resultados, observamos que o complexo DNA-PK possui mecanismos adicionais durante a infecção por um vírus com genoma de RNA, aumentando a resposta antiviral via IFN-III, quando utilizado o ZIKV como agente de infecção.

Com o objetivo de estudar o papel do complexo DNA-PK durante a infecção por ZIKV, realizamos a técnica de CRISPR/Cas9 em células da linhagem A549 para editar o gene *PRKDC*, o qual codifica para a proteína DNA-PKcs, subunidade catalítica do complexo DNA-PK. Para a edição de DNA-PKcs, foi escolhida a região que codifica para o domínio quinase, localizada na porção C-terminal do gene (JETTE; LEES-MILLER, 2015). Em nossos resultados, caracterizamos dois clones deficientes para o gene *PRKDC* e escolhemos o clone 35 para as posteriores análises. Apesar da mutação ser direcionada para a porção final da proteína, observamos que as células *PRKDC*^{-/-} tornaram-se deficientes para a proteína integralmente.

Com as células *PRKDC*^{-/-} foi possível analisar a suscetibilidade dessas células durante a infecção por ZIKV. Para uma caracterização sólida do fenótipo celular durante a infecção, utilizamos diversas técnicas, onde demonstramos um aumento da suscetibilidade nas células *PRKDC*^{-/-} ainda no início da infecção, o qual se estendeu nos tempos seguintes. Além disso, observamos que nos tempos tardios há um declínio na porcentagem de células infectadas em ambos os grupos, onde confirmamos que está associado com o aumento da morte celular causada pela infecção. Também observamos que a quantidade de vírus intracelular acumulado durante o tempo de infecção é semelhante entre os grupos, indicando que a diferença na infecção entre as células selvagens e deficientes está na quantidade de células infectadas e de

vírus liberados no meio extracelular, confirmado pelo aumento dos títulos virais nas células *PRKDC*^{-/-} desde o início da infecção. Além disso, observamos um aumento na concentração de RNA de ZIKV em células *PRKDC*^{-/-} a partir de 24 horas de infecção, corroborando com as análises anteriores. Por fim, também confirmamos o aumento da suscetibilidade nas células deficientes ao analisar a velocidade no espalhamento viral para as células adjacentes, na qual a infecção por ZIKV se espalha mais rapidamente nas células deficientes para DNA-PKcs em comparação com as células selvagens. Esse conjunto de observações demonstraram que a proteína DNA-PKcs é crítica para o controle eficiente da infecção por ZIKV. Esses resultados divergem de Vetter e colaboradores (2012), onde foi utilizado RNA de interferência (iRNA) para silenciar as proteínas Ku70 e Ku80 do complexo DNA-PK em hepatócitos humanos da linhagem Huh7 infectadas por *Dengue virus*, não sendo observado diferença nos títulos virais (VETTER et al., 2012). Entretanto, além dos autores utilizarem um flavivírus diferente, as células Huh7 possuem a característica de não ativar os mecanismos antivirais via IFN-I (KESKINEN et al., 1999), o que pode diferenciar da resposta em outros tipos celulares.

Com a caracterização da importância que o complexo DNA-PK exerce na infecção por ZIKV, o próximo passo foi elucidar o mecanismo relacionado a esse fenótipo. Sabe-se que o complexo DNA-PK localiza-se majoritariamente no núcleo e a única proteína de ZIKV descrita em que há translocação para o núcleo é a proteína NS5 (LUNDBERG et al., 2019; TAN et al., 2019). Por esse motivo, investigamos na literatura vias nucleares moduladas por NS5 e DNA-PK, na qual observamos que ambas as proteínas regulam o metabolismo de RNA, sendo que a regulação do *splicing* alternativo da proteína SRSF1 é comum entre elas (MIAO et al., 2019; LIU et al., 2019). Com base nessas informações, investigamos se há diferença no *splicing* alternativo do gene *SRSF1* nas células *PRKDC*^{-/-} em relação às células selvagens, onde observamos que a deficiência de DNA-PKcs diminui o *splicing* alternativo de *SRSF1*, mesmo na ausência de infecção, diferente dos achados de Liu e colaboradores (2019), onde observaram que é necessário que ocorra a autofosforilação de DNA-PKcs induzida por DSB para que decorra a regulação do *splicing* alternativo de *SRSF1*. Entretanto, durante a infecção por ZIKV, observamos um aumento do *splicing* alternativo de *SRSF1* na mesma proporção entre as células WT e deficientes para DNA-PKcs. Dessa forma, embora tenhamos observado que ambos ZIKV e DNA-PKcs regulam o *splicing* alternativo de *SRSF1*, sugerimos que o aumento da suscetibilidade da infecção nas células *PRKDC*^{-/-} ocorre por um mecanismo independente dessa regulação.

A próxima abordagem que realizamos em relação ao NS5 foi a possibilidade de ligação direta entre essa proteína viral e a DNA-PKcs. Essa possibilidade foi levantada devido à localização nucleolar do NS5 e das proteínas Ku, do complexo DNA-PK, durante a infecção por *Dengue virus* (VETTER et al., 2012). Para analisar a ligação entre DNA-PKcs e NS5, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação, utilizando os vetores NS5-FLAG e NS5Δ-FLAG, o qual contém uma mutação que impede a translocação do citoplasma para o núcleo. Demonstramos que não há ligação direta entre as proteínas DNA-PKcs e NS5, observado apenas no tempo de 24 horas, pois a expressão de NS5 não ocorreu no tempo 8 horas, onde foi utilizado o NS5Δ-FLAG. No entanto, devido ao problema na marcação de DNA-PKcs no grupo *input*, utilizado como controle da técnica, deve-se repetir esse experimento para confirmar os achados.

Paralelamente aos experimentos direcionados à NS5, também investigamos se o aumento da suscetibilidade das células *PRKDC*^{-/-} durante a infecção por ZIKV era devido à diminuição da resposta antiviral exercida por IFN-I. Para essa abordagem, foi realizada uma análise transcricional de genes relacionados a essa via, na qual demonstramos que a transcrição de *IFNB* ocorre de maneira independente de DNA-PKcs, porém observamos uma inibição da transcrição de *IFIT2* nas células *PRKDC*^{-/-} durante a infecção por ZIKV. A transcrição de outros ISGs, como *CXCL10* e *IFIT3*, bem como a expressão proteica de IFIT3 não são regulados por DNA-PKcs. Utilizando fibroblastos murinos, Ferguson e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão eficiente de *Ifnb*, *Cxcl10*, *Ifit2*, entre outros, é dependente de DNA-PKcs durante infecções por vírus com genoma de DNA, como *Vaccinia virus*, porém é independente durante a infecção por vírus de RNA, como *Newcastle Disease virus* (FERGUSON et al., 2012), corroborando em parte com os nossos resultados, uma vez que observamos uma transcrição diferencial de *IFIT2*.

Sob o estímulo por DNA exógeno ou durante a infecção por vírus de DNA, a proteína Ku70, do complexo DNA-PK, transloca-se do núcleo para o citoplasma e se liga ao DNA exógeno, formando um complexo com STING, o qual induz fortemente a expressão de IFN-λ1 (SUI et al., 2017; ZHANG et al., 2011a). No entanto, não foram encontradas evidências na literatura sobre a importância do complexo DNA-PK na indução da expressão de IFN-λ1 durante infecções por vírus com genoma de RNA. Com base nessas informações, hipotetizamos que a diminuição na expressão de IFIT2 durante a infecção por ZIKV está associada com a regulação da expressão IFN-λ1. Para avaliar essa hipótese, analisamos a transcrição *IFNLI* durante a infecção por ZIKV e observamos que a indução eficiente de IFN-λ1 é dependente

DNA-PKcs. Sabendo que IFN- λ 1 induz fortemente a expressão de IFIT2 (PERVOLARAKI et al., 2018), sugerimos que o bloqueio parcial da expressão de IFN- λ 1 é o responsável pela diminuição da expressão de IFIT2, além de outros ISGs que contribuem para o controle da infecção. Além disso, também demonstramos que a expressão de NF- κ B, canonicamente ativada pelos sensores de DNA e RNA, e que se liga na região promotora dos IFN-I e IFN-III (MANIATIS; THANOS, 1995; JIANG et al., 2015) ocorre de maneira independente de DNA-PKcs.

Para analisar se a função quinase de DNA-PKcs é a responsável pelo controle da infecção e da expressão de IFN- λ 1, utilizamos o NU7441, um inibidor potente e altamente seletivo de DNA-PKcs, comparado com outros inibidores dessa enzima (HARNOR; BRENNAN; CANO, 2017; ZHAO et al., 2006). Definimos a concentração de NU7441 não citotóxica, o qual foi utilizado durante a infecção por ZIKV. Observamos que a inibição de DNA-PKcs aumenta a suscetibilidade das células WT para valores próximos do observado nas células *PRKDC*^{-/-}. Além disso, nas menores concentrações o inibidor não alterou a infecção nas células deficientes para DNA-PKcs, confirmando a seletividade. No entanto, maiores concentrações de NU7441 também aumentaram os títulos virais na célula *PRKDC*^{-/-}, indicando que há um limite para a seletividade do inibidor, o qual está associada com a inibição de outros membros da família *PI 3-kinase related kinase* (PIKK), como PI3K e mTOR (LEAHY et al., 2004). Por esse motivo, definimos uma concentração de NU7441 em que não altera o fenótipo nas células deficientes. Com essa concentração demonstramos que a inibição farmacológica de DNA-PKcs durante a infecção por ZIKV não afeta a transcrição de *IFNB*, mas bloqueia parcialmente a transcrição de *IFNL1* nas células WT, não apresentando efeito nas células *PRKDC*^{-/-}, sugerindo que a porção quinase da enzima DNA-PKcs é necessária para a sua ação na indução da expressão de IFN- λ 1, podendo ser o motivo para o aumento da suscetibilidade ao ZIKV. Curiosamente, a inibição de DNA-PKcs aumentou a transcrição de *IFIT2* nas células WT, divergindo do fenótipo observado ao comparar com as células *PRKDC*^{-/-}. Esse resultado abre outra possibilidade de ação do DNA-PKcs, pois a autofosforilação dessa quinase induzida por DSB pode estimular sua migração para o nucléolo, onde regula a geração de pré-mRNA no spliceossoma (LIU et al., 2019). Dessa forma, sugere-se que durante a infecção por ZIKV, a proteína DNA-PKcs pode estar exercendo funções dependentes e independentes da sua função quinase, que impactam na transcrição de IFIT2.

O IFN-I e o IFN-III são expressos, principalmente, através dos fatores de transcrição IRF3 e IRF7, mas também podem ser expressos através do IRF1 (LAZEAR; SCHOGGINS;

DIAMOND, 2019; PANDA et al., 2019). Analisamos a translocação desses IRFs do citoplasma para o núcleo durante a infecção por ZIKV, o qual demonstramos que a translocação de IRF3 e IRF1 ocorre de maneira independente de DNA-PKcs. Além disso, a infecção por ZIKV não induziu a translocação de IRF7 em ambos os grupos. Demonstramos também que há um aumento na transcrição de IRF7 durante a infecção, porém sem diferença entre os grupos. Corroborando com os nossos resultados, Ferguson e colaboradores (2012) demonstraram que, em fibroblastos murinos, a proteína DNA-PKcs é essencial para a translocação de IRF3 sob estímulo de DNA, mas sem interferência quando o estímulo é RNA (FERGUSON et al., 2012). Adicionalmente, observamos que as células com acúmulo de IRF1 no núcleo eram as células negativas para a marcação do vírus, sugerindo que a translocação ocorre nas células não infectadas (*bystander*). Como a marcação da proteína E do ZIKV ocorre a partir de 12 horas de infecção (dados não demonstrados), decidimos utilizar a marcação de dsRNA, o qual ocorre nos estágios iniciais da infecção (dados não demonstrados), com isso confirmamos que as células com translocação de IRF1 são as *bystander*, o qual acontece de maneira independente de DNA-PKcs. Além disso, também avaliamos a translocação do citoplasma para o núcleo do fator de transcrição IRF5, não observando esse fenótipo nos grupos testados. Essa análise foi realizada pois o IRF5 também pode ser ativado durante a infecção e posteriormente se ligar na região promotora dos IFNs (ANDRILENAS et al., 2018). Com esse conjunto de resultados sugerimos que a diminuição da expressão de IFN- λ 1 nas células *PRKDC*^{-/-} ocorre por um mecanismo posterior à translocação dos fatores de transcrição. Experimentos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual a proteína DNA-PKcs regula negativamente a expressão de IFN- λ 1, o qual sugerimos que seja pela regulação da região promotora.

Nossa próxima abordagem foi elucidar o mecanismo de ativação de DNA-PKcs durante a infecção por ZIKV, o qual sugerimos que a infecção poderia estar induzindo a via dos sensores de DNA, onde seria o responsável pela a ativação de DNA-PKcs. Para essa abordagem, investigamos fontes de DNA que podem ativar DNA-PKcs. Primeiramente avaliamos se DNA exógeno induz a transcrição de IFN- β e do ISG CXCL10 em células A549, onde utilizamos DNA de diferentes origens (ISD ou CT-DNA), além de um estímulo por RNA sintético (Poli I:C) como um indutor da via dos sensores de RNA. Ferguson e colaboradores (2012) demonstraram que em fibroblastos murinos estimulados com ISD, ocorre a ativação das vias relacionadas aos IFN-I e ISGs por um mecanismo dependente de DNA-PKcs (FERGUSON et al., 2012). Além disso, Burleigh e colaboradores (2020), utilizando células humanas da linhagem HEK293, também demonstraram que o estímulo com ISD ou CT-DNA induz a

fosforilação de IRF3 por um mecanismo dependente de DNA-PKcs (BURLEIGH et al., 2020). No entanto, observamos que as células A549 respondem apenas ao estímulo de RNA, impossibilitando as análises sob estímulo de DNA nesse modelo celular. São necessárias outras análises para confirmar se células A549 não respondem à DNA, uma vez que Wang e colaboradores (2019) observaram aumento na transcrição de IFN- β nessas células estimuladas com DNA derivado de *E. coli* (WANG et al., 2019). Outra fonte de DNA que pode estar envolvida com a ativação de DNA-PKcs seria o DNA nuclear por quebra na dupla fita de DNA (DSB). Devhare e colaboradores (2017) demonstraram que ZIKV pode causar DSB em células neuronais, observado pela marcação da histona γ H2A.X fosforilada (DEVHARE et al., 2017). Dessa forma, analisamos a capacidade do ZIKV em causar DSB nas células A549 e demonstramos que de maneira basal, há mais células com DSB no grupo *PRKDC*^{-/-}, sugerindo um desequilíbrio na manutenção do DNA causado pela ausência de DNA-PKcs. Esse resultado corrobora com a literatura, pois sabe-se que DNA-PKcs é essencial para a reação de recombinação não homóloga que ocorre durante o reparo do DNA (GU et al., 1997; LIU et al., 2019; NUSSENZWEIG et al., 1996; YANG et al., 2018). Além disso, o inibidor NU7441 aumentou o número de focos de γ H2A.X fosforilado induzido por etoposídeo, corroborando com o observado na literatura, onde observa-se que a inibição de DNA-PKcs aumenta a sensibilidade das células ao dano de DNA (YANG et al., 2018; ZHAO et al., 2006). Demonstramos esse mesmo efeito nas células deficientes para DNA-PKcs, confirmando que a ausência ou a inibição farmacológica do complexo DNA-PK afeta o sistema de reparo de DNA. No entanto, observamos que a infecção por ZIKV não induz DSB em células A549, sugerindo que a ativação de DNA-PKcs ocorre de maneira independente de DNA exógeno ou dano nuclear.

Uma maneira adicional para ativação de DNA-PKcs em nosso modelo seria através do DNA mitocondrial (mtDNA) liberado por mitocôndrias danificadas durante a infecção. Evidências na literatura demonstram que a infecção por ZIKV e DENV induzem dano mitocondrial, o qual ativa a via dos sensores de DNA através de mtDNA liberado no citoplasma (AGUIRRE et al., 2017; SUN et al., 2017; LEDUR et al., 2020). Dessa forma, estudos adicionais são necessários para avaliar a ativação de DNA-PKcs por mtDNA durante a infecção por ZIKV em nosso modelo.

Com o objetivo de elucidar o impacto da via dos sensores de RNA para a indução da expressão de IFN- β ou IFN- λ 1 durante a infecção por ZIKV, avaliamos essa resposta em células deficientes para o sensor de RNA RIG-I e em células deficientes para as quinases responsáveis

pela fosforilação de IRF3 (TBK1, IKK ϵ e TBK1/IKK ϵ). Os resultados demonstraram que RIG-I é essencial para a indução de *IFNB* e *IFNLI* durante a infecção por ZIKV, pois a ausência desse sensor de RNA aboliu completamente a transcrição, sugerindo que as transcrições dos IFN-I e IFN-III durante a infecção por ZIKV ocorrem de maneira independentemente da via dos sensores de DNA. De fato, Schilling e colaboradores (2020) demonstraram que RIG-I possui um papel dominante na indução das vias de IFN-I durante a infecção por ZIKV em células A549 (SCHILLING et al., 2020). Além disso, também observamos que a presença de TBK1 ou IKK ϵ é suficiente para que ocorra a indução dos IFNs analisados, porém a ausência das duas quinases ao mesmo tempo também bloqueou completamente a indução dos IFNs.

Os resultados apresentados sugerem que durante a infecção por ZIKV em células epiteliais da linhagem A549, a via dos sensores de RNA é ativada via RIG-I, resultando na translocação de IRF1 e IRF3 do citoplasma para o núcleo, onde ocorre a indução da transcrição dos IFN-I e IFN-III. Além disso, DNA-PKcs potencializa a expressão de IFN- λ 1 por um mecanismo posterior à translocação citoplasma-núcleo dos fatores de transcrição, o qual é importante para a resposta antiviral e controle da infecção. Sugere-se que o mecanismo de ação do complexo DNA-PK está envolvido com a ligação e ativação da região promotora de IFN- λ 1 durante a infecção por ZIKV, o qual experimentos adicionais são necessários para confirmação dessa nova hipótese. Nossos resultados revelaram novos mecanismos pelos quais os sensores de ácidos nucleicos induzem a expressão de IFN-III, essenciais para uma resposta antiviral eficiente.

5 CONCLUSÕES

Concluimos com os dados apresentados que a deficiência da quinase DNA-PKcs aumenta a suscetibilidade das células A549 contra a infecção por *Zika virus*. Observamos que a suscetibilidade à infecção ocorre de maneira independente da regulação do *splicing* alternativo de mRNA, além de que não há ligação direta entre DNA-PKcs e a NS5, proteína não-estrutural do ZIKV. Concluimos também que durante a infecção por ZIKV, a expressão de alguns ISGs é regulada por DNA-PKcs através de um mecanismo independente de IFN-I e dependente de IFN-III. Demonstramos que a translocação dos fatores de transcrição IRF1 e IRF3 ocorre de maneira independente de DNA-PKcs e que células A549 não respondem à DNA exógeno, bem como a infecção por ZIKV não induz dano de DNA nessa linhagem celular. Concluimos também que a indução dos IFN-I e IFN-III, e conseqüentemente a indução dos ISGs, durante a infecção por ZIKV ocorre de maneira dependente do sensor de RNA RIG-I e do complexo IKK ϵ /TBK1. Em suma, sugerimos que durante a infecção por ZIKV, o complexo DNA-PK é ativado e atua no aumento da expressão de IFN- λ 1, o qual induz a expressão de ISGs, responsáveis pelo controle da infecção (**Figura 17**).

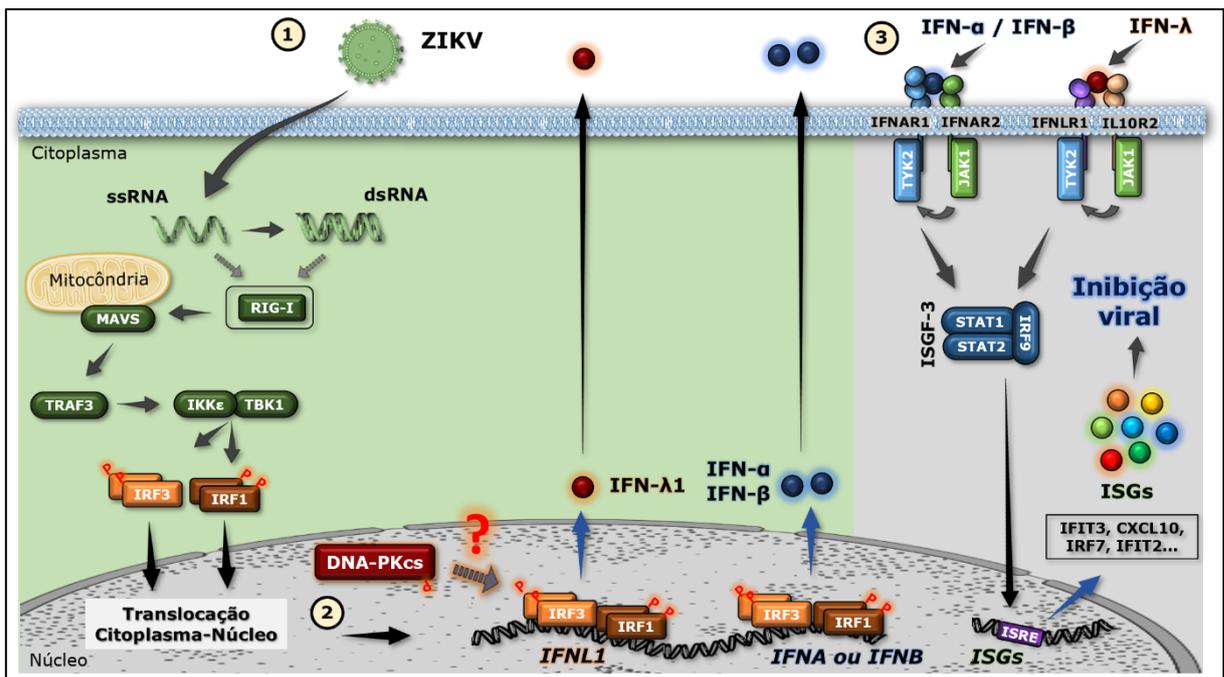


Figura 17. DNA-PKcs induz a expressão de IFN- λ 1 durante a infecção por ZIKV. (1) A infecção por *Zika virus* induz a liberação do ssRNA viral no meio intracelular, onde é detectado exclusivamente pelo sensor de RNA RIG-I, que ativa a proteína adaptadora MAVS, o qual transmite o sinal para TRAF3 e segue pela ativação das proteínas IKK ϵ e TBK1, os quais fosforilam os fatores de transcrição IRF3 e IRF1, permitindo a translocação citoplasma-núcleo. (2) Os fatores de transcrição IRF3 e IRF1 se ligam na região promotora dos IFN-I (ex. *IFNB* e *IFNA*) e IFN-III (ex. *IFNL1*), induzindo a transcrição dos mesmos. A transcrição de *IFNL1* é potencializada pela proteína DNA-PKcs por mecanismos a serem elucidados. (3) Os interferons são secretados para o meio extracelular e atuam de maneira autócrina e parácrina (não demonstrado), ligam-se em seu receptor comum, no qual os IFN-I ligam-se em IFNAR1/IFNAR2 e os IFN-III se ligam em IFNLR1/IL10R2. A ligação a os receptores ativa a via JAK-STAT, a qual induz o recrutamento de IRF9, formando o fator ISGF-3 e permitindo sua translocação para o núcleo. O ISGF-3 liga-se na região promotora ISRE e inicia a transcrição dos genes estimulados por IFN (ISGs), um arsenal proteico que inibe a replicação viral por mecanismos distintos. Fonte: o autor.

ANEXO 1 – Ligação do complexo DNA-PK em RNA de DENV

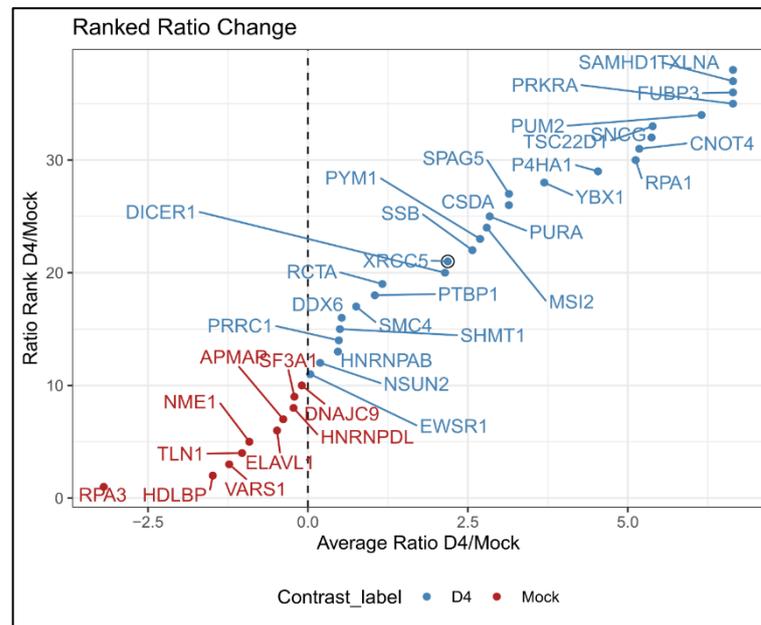


Figura 18. Ligação de Ku78 (XRC5), componente do complexo DNA-PK, ao RNA de *Dengue virus*. A razão entre várias comparações de proteínas ligadas ao controle (*Mock*) e em DENV-4 (*D4*) de três experimentos independentes foram analisadas. A média das razões foram utilizadas para ranquear as proteínas, baseada na mudança de uma condição para a outra.

REFERÊNCIAS

ABLASSER, A. et al. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. **Nature**, v. 503, n. 7477, p. 530–534, 2013.

AGUIRRE, S. et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. **Nature microbiology**, v. 2, p. 17037, 27 mar. 2017.

ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732–738, 18 out. 2001.

ALLEN, G.; FANTES, K. H. A family of structural genes for human lymphoblastoid (leukocyte-type) interferon. **Nature**, v. 287, n. 5781, p. 408–411, 2 out. 1980.

ANDRILENAS, K. K. et al. DNA-binding landscape of IRF3, IRF5 and IRF7 dimers: implications for dimer-specific gene regulation. **Nucleic acids research**, v. 46, n. 5, p. 2509–2520, 16 mar. 2018.

AU, W. C. et al. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 25, p. 11657–11661, 5 dez. 1995.

BARNES, B. J.; MOORE, P. A.; PITHA, P. M. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon α genes. **The Journal of biological chemistry**, 2001.

BÜRCKSTÜMMER, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 266–272, 2009.

BURDETTE, D. L. et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. **Nature**, v. 478, n. 7370, p. 515–518, 25 set. 2011.

BURLEIGH, K. et al. Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. **Science immunology**, v. 5, n. 43, 24 jan. 2020.

CHEMUDUPATI, M. et al. From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. **Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 3, p. 382–394, mar. 2019.

CHIU, Y.-H.; MACMILLAN, J. B.; CHEN, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 576–591, 7 ago. 2009.

DALE, T. C. et al. Rapid activation by interferon alpha of a latent DNA-binding protein present in the cytoplasm of untreated cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 4, p. 1203–1207, fev. 1989.

DE MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J. Type I interferons. **International reviews of immunology**, v. 17, n. 1–4, p. 53–73, 1998.

DERYNCK, R. et al. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. **Nature**, v. 285, n. 5766, p. 542–547, 19 jun. 1980.

DEVHARE, P. et al. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell death & disease**, v. 8, n. 10, p. e3106, 12 out. 2017.

DHIR, A. et al. Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans. **Nature**, v. 560, n. 7717, p. 238–242, ago. 2018.

DIEBOLD, S. S. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1529–1531, 5 mar. 2004.

DOU, L. et al. The regulation role of interferon regulatory factor-1 gene and clinical relevance. **Human immunology**, v. 75, n. 11, p. 1110–1114, nov. 2014.

EPSTEIN, D. A.; TORRENCE, P. F.; FRIEDMAN, R. M. Double-stranded RNA inhibits a phosphoprotein phosphatase present in interferon-treated cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 1, p. 107–111, jan. 1980.

FALCOFF, R. Some properties of virus and immune-induced human lymphocyte interferons. **The Journal of general virology**, v. 16, n. 2, p. 251–253, ago. 1972.

FERGUSON, B. J. et al. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. **eLife**, v. 1, p. e00047, 18 dez. 2012.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 509–513, 26 mar. 2009.

FIRMBACH-KRAFT, I. et al. tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. **Oncogene**, v. 5, n. 9, p. 1329–1336, set. 1990.

FLYNN, R. A. et al. Systematic discovery and functional interrogation of SARS-CoV-2 viral RNA-host protein interactions during infection. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 6 out. 2020.

FU, X. Y. et al. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7840–7843, 15 ago. 1992.

GOPALA REDDY, S. B.; CHIN, W.-X.; SHIVANANJU, N. S. Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. **Biochemical pharmacology**, v. 154, p. 54–63, ago. 2018.

GRAY, P. W.; GOEDDEL, D. V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, v. 298, n. 5877, p. 859–863, 26 ago. 1982.

GU, Y. et al. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 15, p. 8076–8081, 1997.

HARNOR, S. J.; BRENNAN, A.; CANO, C. Targeting DNA-Dependent Protein Kinase for Cancer Therapy. **ChemMedChem**, v. 12, n. 12, p. 895–900, 21 jun. 2017.

HAUPTMANN, R.; SWETLY, P. A novel class of human type I interferons. **Nucleic acids research**, v. 13, n. 13, p. 4739–4749, 11 jul. 1985.

HEIL, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1526–1529, 5 mar. 2004.

HEMMI, H. et al. Erratum A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 646–646, 2001.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514–518, 2009.

HU, M.-M.; SHU, H.-B. Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. **Annual review of immunology**, v. 38, p. 79–98, 26 abr. 2020.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society**, v. 147, n. 927, p. 258–267, 12 set. 1957.

ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 674–678, 2008.

ISHIKAWA, H.; MA, Z.; BARBER, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 788–792, 2009.

JETTE, N.; LEES-MILLER, S. P. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 117, n. 2–3, p. 194–205, mar. 2015.

JUANG, Y.-T. et al. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 17, p. 9837–9842, 1998.

KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, v. 441, n. 7089, p. 101–105, 4 maio 2006.

KATO, H. et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 7, p. 1601–1610, 7 jul. 2008.

KAUFMANN, S. H. E. et al. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 17, n. 1, p. 35–56, jan. 2018.

KAWAI, T. et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 981–988, 2005.

KESSLER, D. S.; LEVY, D. E.; DARNELL, J. E., Jr. Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 22, p. 8521–8525, nov. 1988.

KIM, S. H. et al. Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFNAR1 and IFNAR2. **Gene**, v. 196, n. 1–2, p. 279–286, 1 set. 1997.

KIM, T. et al. Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15181–15186, 24 ago. 2010.

KONDO, T. et al. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 8, p. 2969–2974, 19 fev. 2013.

KOTENKO, S. V. et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature immunology**, v. 4, n. 1, p. 69–77, 1 jan. 2003.

KOTULA, E. et al. DNA-PK target identification reveals novel links between DNA repair signaling and cytoskeletal regulation. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80313, 25 nov. 2013.

KOVANICH, D. et al. Analysis of the Zika and Japanese Encephalitis Virus NS5 Interactomes. **Journal of proteome research**, v. 18, n. 8, p. 3203–3218, 2 ago. 2019.

LANFORD, R. E. et al. Genomic response to interferon- α in chimpanzees: Implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics. **Hepatology**, v. 43, n. 5, p. 961–972, 2006.

LAZEAR, H. M.; SCHOGGINS, J. W.; DIAMOND, M. S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 907–923, 16 abr. 2019.

LEAHY, J. J. J. et al. Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 24, p. 6083–6087, 20 dez. 2004.

LENGYEL, P. Biochemistry of interferons and their actions. **Annual review of biochemistry**, v. 51, p. 251–282, 1982.

LEVY, D. E. et al. Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. **Genes & development**, v. 2, n. 4, p. 383–393, abr. 1988.

LIN, R. et al. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 5, p. 2986–2996, maio 1998.

LIU, S. et al. Genotoxic stress causes the accumulation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylated at serine 2056 at nuclear speckles and alters pre-mRNA alternative splicing. **FEBS open bio**, v. 9, n. 2, p. 304–314, fev. 2019.

LUND, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 15, p. 5598–5603, 13 abr. 2004.

MARIÉ, I.; DURBIN, J. E.; LEVY, D. E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. **The EMBO journal**, v. 17, n. 22, p. 6660–6669, 16 nov. 1998.

MASMEJAN, S. et al. Zika Virus. **Pathogens**, v. 9, n. 11, 28 out. 2020.

MCKENDRY, R. et al. High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 24, p. 11455–11459, 15 dez. 1991.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 24 jul. 1997.

MEYLAN, E. et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. **Nature**, v. 437, n. 7062, p. 1167–1172, 20 out. 2005.

MIAO, M. et al. Proteomics Profiling of Host Cell Response via Protein Expression and Phosphorylation upon Dengue Virus Infection. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 549–562, out. 2019.

MIYASHITA, M. et al. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 18, p. 3802–3819, set. 2011.

MOSTAFAVI, S. et al. Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 564–578, 28 jan. 2016.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013.

MÜLLER, M. et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- α/β and - γ signal transduction. **Nature**, v. 366, n. 6451, p. 129–135, 1993.

NOVICK, D.; COHEN, B.; RUBINSTEIN, M. The human interferon $\alpha\beta$ receptor: Characterization and molecular cloning. **Cell**, v. 77, n. 3, p. 391–400, 6 maio 1994.

NUSSENZWEIG, A. et al. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 551–555, 1996.

- OGANESYAN, G. et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 208–211, 2006.
- OOI, Y. S. et al. An RNA-centric dissection of host complexes controlling flavivirus infection. **Nature microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2369–2382, dez. 2019.
- OUYANG, S. et al. Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclic di-GMP Binding. **Immunity**, v. 36, n. 6, p. 1073–1086, 2012.
- OWCZAREK, C. M. et al. Cloning and characterization of soluble and transmembrane isoforms of a novel component of the murine type I interferon receptor, IFNAR 2. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 38, p. 23865–23870, 19 set. 1997.
- PANDA, D. et al. IRF1 Maintains Optimal Constitutive Expression of Antiviral Genes and Regulates the Early Antiviral Response. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1019, 15 maio 2019.
- PAVLOVIC, J. et al. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. **Journal of virology**, v. 64, n. 7, p. 3370–3375, jul. 1990.
- PERVOLARAKI, K. et al. Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 11, p. e1007420, nov. 2018.
- ROTHENFUSSER, S. et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. **Journal of immunology**, v. 175, n. 8, p. 5260–5268, 15 out. 2005.
- SAHA, S. K. et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. **The EMBO journal**, v. 25, n. 14, p. 3257–3263, 26 jul. 2006.
- SATO, M. et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 539–548, out. 2000.
- SAUER, J.-D. et al. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. **Infection and immunity**, v. 79, n. 2, p. 688–694, fev. 2011.
- SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 513–545, 6 fev. 2014.
- SCHOGGINS, J. W. et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 481–485, 28 abr. 2011.
- SCHOGGINS, J. W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? **Annual Review of Virology**, v. 6, n. 1, p. 567–584, 29 set. 2019.
- SETH, R. B. et al. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 669–682, 9 set. 2005.

SHAO, Z. et al. DNA-PKcs has KU-dependent function in rRNA processing and haematopoiesis. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 291–296, mar. 2020.

SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature immunology**, v. 4, n. 1, p. 63–68, jan. 2003.

STREULI, M.; NAGATA, S.; WEISSMANN, C. At least three human type alpha interferons: structure of alpha 2. **Science**, v. 209, n. 4463, p. 1343–1347, 19 set. 1980.

STROTTMANN, D. M. et al. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

SUI, H. et al. STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN- λ 1 in response to exogenous DNA. **Science signaling**, v. 10, n. 488, 18 jul. 2017.

SUN, B. et al. Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3594, 15 jun. 2017.

SUN, L. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 786–791, 15 fev. 2013.

SYEDBASHA, M.; EGLI, A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 119, 28 fev. 2017.

TAKAOKA, A. et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 501–505, 2007.

TAN, M. J. A. et al. The Potential Role of the ZIKV NS5 Nuclear Spherical-Shell Structures in Cell Type-Specific Host Immune Modulation during ZIKV Infection. **Cells**, v. 8, n. 12, 26 nov. 2019.

TEIJARO, J. R. Type I interferons in viral control and immune regulation. **Current opinion in virology**, v. 16, p. 31–40, fev. 2016.

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 997–1004, 2010.

UZÉ, G.; LUTFALLA, G.; GRESSER, I. Genetic transfer of a functional human interferon α receptor into mouse cells: Cloning and expression of its c-DNA. **Cell**, v. 60, n. 2, p. 225–234, 1990.

VANCE, R. E. Cytosolic DNA Sensing: The Field Narrows. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 227–228, 2016.

VELAZQUEZ, L. et al. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. **Cell**, v. 70, n. 2, p. 313–322, 24 jul. 1992.

VETTER, M. L. et al. Chemoproteomic profiling identifies changes in DNA-PK as markers of early dengue virus infection. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 12, p. 2019–2026, 21 dez. 2012.

VOIGT, E. A.; YIN, J. Kinetic Differences and Synergistic Antiviral Effects Between Type I and Type III Interferon Signaling Indicate Pathway Independence. **Journal of interferon &**

cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, v. 35, n. 9, p. 734–747, set. 2015.

WANG, B. et al. Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 75, n. 10, p. 1723–1736, maio 2018.

WANG, R. et al. Lipopolysaccharide enhances DNA-induced IFN- β expression and autophagy by upregulating cGAS expression in A549 cells. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 5, p. 4157–4164, 18 nov. 2019.

WATHELET, M. G. et al. Virus Infection Induces the Assembly of Coordinately Activated Transcription Factors on the IFN- β Enhancer In Vivo. **Molecular Cell**, v. 1, n. 4, p. 507–518, 1998.

WOODWARD, J. J.; IAVARONE, A. T.; PORTNOY, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1703–1705, 25 jun. 2010.

WU, J. et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 826–830, 15 fev. 2013.

XU, L.-G. et al. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. **Molecular cell**, v. 19, n. 6, p. 727–740, 16 set. 2005.

YANG, L. et al. Inhibition of DNA-PK activity sensitizes A549 cells to X-ray irradiation by inducing the ATM-dependent DNA damage response. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 6, p. 7545–7552, jun. 2018.

YONEYAMA, M. et al. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. **The EMBO journal**, v. 17, n. 4, p. 1087–1095, 16 fev. 1998.

YONEYAMA, M. et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. **Journal of immunology**, v. 175, n. 5, p. 2851–2858, 1 set. 2005.

YOO, S.; DYNAN, W. S. Characterization of the RNA binding properties of Ku protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1336–1343, 3 fev. 1998.

ZHANG, X. et al. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. **Journal of immunology**, v. 186, n. 8, p. 4541–4545, 15 abr. 2011a.

ZHANG, Z. et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. **Nature immunology**, v. 12, n. 10, p. 959–965, 4 set. 2011b.

ZHAO, Y. et al. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. **Cancer research**, v. 66, n. 10, p. 5354–5362, 15 maio 2006.

ZHONG, B. et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. **Immunity**, v. 29, n. 4, p. 538–550, 17 out. 2008.