



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Almerinda Agrelli

**ANÁLISES *IN SILICO* E *IN VITRO* DO PAPEL DA MATURAÇÃO VIRAL NA
INFECTIVIDADE DO VÍRUS ZIKA**

Recife – PE

2019

ALMERINDA AGRELLI

**ANÁLISES *IN SILICO* E *IN VITRO* DO PAPEL DA MATURAÇÃO VIRAL NA
INFECTIVIDADE DO VÍRUS ZIKA**

Defesa de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Co-orientadores: Prof. Dr. Sergio Crovella

Prof. Dr. Ronaldo Celerino

Dr. Ronald Rodrigues de Moura

Recife – PE

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Agrelli, Almerinda

Análises *in silico* e *in vitro* do papel da maturação viral na infectividade do vírus Zika / Almerinda Agrelli. – 2019.

120 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão.

Coorientadores: .Prof. Dr. Sergio Crovella, Prof. Dr. Ronaldo Celerino, Dr. Ronald Rodrigues de Moura.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2019. Inclui referências e anexos.

1. Arboviroses. 2. Vírus da Zika. I. Brandão, Lucas André Cavalcanti (orientador). II. Crovella, Sergio (coorientador). III. Celerino, Ronaldo (coorientador). IV. Moura, Ronald Rodrigues de (coorientador) V. Título.

616.9185

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 140

ALMERINDA AGRELLI

**ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DO PAPEL DA MATURAÇÃO VIRAL NA
INFECTIVIDADE DO VÍRUS ZIKA**

Defesa de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Aprovada em: 26/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Orientador

Departamento de Patologia – Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Membro interno da banca examinadora

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE

Profa. Dra. Paula Sandrin Garcia

Membro interno da banca examinadora

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE

Dr. Antônio Victor Campos Coelho
Membro externo da banca examinadora
Departamento de Biologia Molecular - UFPB

Dra. Camila Albertina Dantas de Lima
Membro externo da banca examinadora
Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Recife – PE

2019

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão, por todos os ensinamentos, pelo apoio e incentivo, e pelas discussões tão valiosas no decorrer deste trabalho.

Aos meus co-orientadores Dr. Ronald de Moura, Dr. Ronaldo Celerino e Prof. Dr. Sergio Crovella pela paciência, suporte e serenidade de sempre, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas de trabalho, por tudo que me ensinaram, pela amizade e convivência com tanta alegria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit/SCTIE/MS pelo suporte financeiro.

“A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimento. É uma maneira de pensar. E isso é fundamental para o nosso sucesso. A ciência nos convida a aceitar os fatos, mesmo quando eles não estão de acordo com nossos preconceitos. Ela nos aconselha a levar hipóteses alternativas em nossas cabeças e ver quais são as que melhor correspondem aos fatos. Impõe-nos um equilíbrio perfeito entre a abertura sem obstáculos a novas ideias, por mais heréticas que sejam, e o mais rigoroso escrutínio cético de tudo – estabelecendo novas idéias e sabedoria. Precisamos da ampla apreciação desse tipo de pensamento. Funciona. É uma ferramenta essencial para uma democracia em uma era de mudança. Nossa tarefa não é apenas treinar mais cientistas, mas também aprofundar a compreensão pública da ciência.”

(Sagan, Carl.1995)

RESUMO

No começo de 2015, um surto do vírus Zika (ZIKV) foi identificado no Brasil. Relatos de um aumento do número de crianças nascidas com microcefalia em áreas afetadas pelo ZIKV começaram a surgir, e o RNA do vírus foi identificado no líquido amniótico de mulheres cujos fetos tinham sido diagnosticados com microcefalia durante o pré-natal. Além da microcefalia, neonatos e fetos com infecção congênita por ZIKV têm tido também outras malformações, especialmente de origem neurológica. O ZIKV é um arbovírus de RNA fita simples, envelopado, do gênero *Flavivirus*, transmitido pelos mosquitos *Aedes*. Os receptores de lectina do tipo C e receptores de fosfatidilserina da célula hospedeira mostraram mediar a entrada de vírus nas células pelas suas interações com a proteína viral E e a fosfatidilserina, respectivamente. Mutações na proteína de membrana viral prM foram, recentemente, associadas à capacidade do ZIKV em infectar células, sugerindo que a prM também poderia atuar como proteína de entrada em alguns casos. Neste trabalho, foram realizados estudos *in silico* e *in vitro* buscando analisar as interações entre os ligantes virais do ZIKV com seus respectivos receptores celulares, considerando nesse contexto o nível de maturação das partículas virais e sua influência no potencial de infectividade. Foi observado que a maturação da partícula viral não é mandatória para adesão e entrada do ZIKV em células, que a proteína prM pode mediar o processo de entrada viral e que utilizar o mimetismo apoptótico (mediado por PS) como mecanismo de entrada em células é vantajoso para o ZIKV.

Palavras-chave: ZIKV. Receptores de Entrada do ZIKV. Maturação da Partícula Viral. Infectividade do ZIKV.

ABSTRACT

In early 2015, an outbreak of Zika virus (ZIKV) was identified in Brazil. Reports of an increase in the number of children born with microcephaly in areas affected by ZIKV began to emerge, and virus RNA was identified in the amniotic fluid of women whose fetuses had been diagnosed with microcephaly during prenatal care. In addition to microcephaly, neonates and fetuses with congenital infection by ZIKV have also had other malformations, especially of neurological origin. ZIKV is an enveloped and single RNA arbovirus of the *Flavivirus* genus transmitted by *Aedes* mosquitoes. Host cell C-type lectin and phosphatidylserine receptors have been shown to mediate virus entry into cells by its interaction with viral protein E and phosphatidylserine, respectively. Mutations in the viral protein prM were recently linked with the ability of ZIKV to infect cells, suggesting that prM could mediate receptor binding in some cases. In this work, we performed *in silico* and *in vitro* assays aiming to analyze the interactions between ZIKV viral ligands and their respective cellular receptors, considering in this context the level of maturation of viral particles and its influence on the infectivity potential. We found that viral particle maturation is not mandatory for ZIKV adhesion and entry into cells, that protein prM may mediate viral entry process and that using apoptotic mimicry (process mediated by PS) as an entry mechanism is advantageous for ZIKV.

Keywords: ZIKV. ZIKV Entry Receptors. Particle Maturation. ZIKV Infectivity.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1 - O ZIKV possui um genoma de sentido positivo de cadeia simples de aproximadamente 11kb que codifica as proteínas estruturas (C, prM e E) e não-estruturais (5'-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'). As caixas abaixo do genoma indicam precursores e proteínas maduras geradas pela cascata de processamento proteolítico. A NS1 é necessária para replicação viral e infecção. Semelhante a outros *Flavivirus*, a proteína NS3 contém dois domínios funcionais: o domínio de protease e o domínio de helicase. De igual forma, a NS5 possui dois domínios, os quais são essenciais para a replicação do genoma: o domínio N-terminal da metiltransferase (MTase), responsável pela estrutura cap 5' do genoma viral, a qual garante uma tradução estável e eficiente e evasão da resposta imune do hospedeiro; e o domínio C-terminal RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), que é responsável pelo processo de replicação do genoma. A importância da NS5 na replicação viral e na modulação da resposta imune do hospedeiro a torna um alvo atraente para o desenvolvimento drogas antivirais.....

29

- Figura 2 - (A) Dímero da proteína E. O código de cores segue a designação padrão de domínios da proteína: I (vermelho), II (amarelo) e III (azul). Os resíduos subjacentes da haste e da transmembrana (TM) são mostrados (laranja). O glicano ligado ao resíduo Asn154 é mostrado em verde. (B) Vista lateral do dímero E-M, mostrando os ectodomínios E (DI, DII e DIII), bem como os domínios transmembranares E-stem e E-TM (laranja). Os domínios

transmembranares M-TM e M-loop estão evidenciados em ciano. Os domínios E-TM e M-TM são encontrados mergulhados dentro da bicamada lipídica. O resíduo de glicosilação Asn154 é localizado no DI, e o glicano pode ser visto representado em verde.....

31

Figura 3 - DC-SIGN é um receptor de lectina do tipo C conhecido por interagir com o Zika e outros Flavivirus, facilitando sua entrada nas células hospedeiras. O domínio transmembranar (TM), o domínio de quinase (KD), o domínio Ig, os domínios de fibronectina tipo 3 (FNIID), o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), a tríade de aminoácidos ácidos (TAA), a tetramerização domínio (TD) e motivo de dileucina (DM) são representados na figura, assim como o N-terminal) e o C-terminal.....

37

Figura 4 - Entrada de *Flavivirus* na célula hospedeira. (A) Absorção e (B) internalização, com consequente mudança na conformação da proteína E, desencadeia a fusão da membrana e liberação do genoma viral; (C) replicação, (D) tradução e início do processo de glicosilação e montagem viral no RE; (E) clivagem da proteína prM no CG; (F) exocitose de partículas maduras e liberação da porção “pr”

41

Figura 5 - Representação da estrutura da partícula imatura (esquerda) e madura (direita) do vírus Zika. A estrutura em dímero da proteína E (sE) aparece em destaque.....

42

Figura 6 - Etapas das análises *in silico* mutacionais e de interação molecular.....

44

Figura 7 -	Etapas dos ensaios <i>in vitro</i> de cultivo celular, infecção viral, incubação na presença de inibidor de furina e quantificação de carga viral.....	50
Figura 8 -	Análise de dinâmica molecular dos receptores TIM1 (em preto), TIM3 (em vermelho) e TIM4 (em verde). Os valores de RMSD (A) em razão to tempo (200ns) evidenciaram uma alta estabilidade de todos os sistemas, com desvios próximos de zero. TIM1 demonstrou o menor valor de RSMD (e, portanto, maior estabilidade), seguido por TIM4 e TIM3. TIM1 também demonstrou menores valores de RMSF (B), SASA (C) e raio de giro (D).....	69
Figura 9 -	Análise de dinâmica molecular das moléculas adaptadoras dos receptores TAM: GAS6 (em preto) e PROS (em vermelho). GAS6 demonstrou menores valores de RSMD (A), de RMSF (B), SASA (C) e raio de giro (D).....	70
Figura 10 -	(A) Estrutura final da prM glicosilada com NAG; (B) LIGPLOT das interações de ligação entre NAG e prM. Os arcos com espinhos vermelhos representam interações hidrofóbicas. As linhas roxas mostram o resíduo Asn70 da prM em ligação direta com NAG.....	71
Figura 11 -	LIGPLOT da comparação de interações da glicoproteína prM com DC-SIGN (A), L-SIGN (B), MMR (C) e CLEC5A (D). Os arcos espinhosos representam interações hidrofóbicas entre a prM (em rosa) e CLR's (em vermelho). As linhas pontilhadas verdes indicam ligações de hidrogênio. Os resíduos Glu353, Asn350, Asp320, Leu321, Lys340 da DC-SIGN interagem com os resíduos Lys85, Arg89, Asp64 da prM por ligações de hidrogénio. Os resíduos Arg321, Arg324, Ser322, Tyr386, Arg380,	

Glu336, Gln335, Asn334, Asn365, Asp367, His290, Asp384, Gln286 da L-SIGN interagem com os resíduos Asp64, Tyr51, Gly86, Arg93, Ala94, Thr96, Arg90, Ser91, Arg89, Tyr78 da prM por ligações de hidrogênio. Os resíduos Glu752, Glu733, Asn750, Tyr718, Asn720, Asn728, His692, Lys649, Lys652 de Asn728, His692, Lys652 da MMR interagem com os resíduos Arg89, Ser101, Arg103, Arg92, Asp63, Ala19, Ile36, Gln37, Ile38, Asp40 prM, Ile36, Gln37, Ile38, Asp40 da prM por ligações de hidrogênio. Os resíduos Lys168 e Glu125 da CLEC5A interagem com os resíduos Glu61 e Asn70 da prM, respectivamente, também por ligações de hidrogênio.....

73

Artigo 2

Figura 1 - Processos de ligação e entrada, replicação, tradução, montagem, maturação e liberação do ZIKV de células infectadas.....

87

Figura 2 - Estrutura dos dímeros da proteína E do ZIKV (código de identificação do PDB: 5IZ7). (A) Domínios proteicos E I (vermelho), II (amarelo) e III (azul). Loop de fusão (FL) é evidenciado no círculo pontilhado. (B) O domínio transmembrana da haste que ancora a proteína na membrana é mostrado em verde. O local de glicosilação (com o glicano, em rosa) é encontrado na região do loop de 150.....

88

Figura 3 - Estruturas possíveis de partículas virais. (A) Partícula imatura exibindo projeções triméricas (prM-E)₃ devido ao pH neutro do retículo endoplasmático. (B) Partícula madura exibindo homodímeros E (E)₂ e M (M)₂ após cliva-

gem completa por furina e secreção a partir de células hospedeiras. (C) estrutura de partícula heterogênea.....

90

Artigo 3

Figura 1 - Mecanismos envolvidos nas interações das células hospedeiras com o vírus Zika. A ligação das glicoproteínas estruturais do ZIKV aos receptores de entrada celular desencadeia a internalização viral através da endocitose dependente de clatrina (1). O pH ácido do lúmen endossômico induz alterações conformacionais da endocitose da superfície viral (1). O pH ácido do lúmen endossômico induz alterações conformacionais nas glicoproteínas da superfície viral, permitindo assim a fusão do envelope viral com a membrana endossômica, causando a libertação do RNA viral no citosol. O RNA viral é então traduzido em proteínas virais (3). Partículas virais imaturas se agrupam dentro do retículo endoplasmático (ER) (4) e o tráfego de vesículas permite a transição do ZIKV do ER para a rede de Golgi (5). O ZIKV passa então pelas cisternas do aparelho de Golgi e promove a maturação viral (6). As partículas maduras do ZIKV são liberadas no ambiente extracelular (7).....

95

Figura 2 - O papel da autofagia durante respostas imunes inatas e adaptativas contra microorganismos invasores. Como componente fundamental da resposta imune inata, a autofagia seletiva degrada os patógenos invasores, principalmente através da sinalização da ubiquitina. Os patógenos ubiquinados são reconhecidos por receptores semelhantes ao sequestosoma-1/p62 (SLRs), que estão envolvidos na criação de uma ponte molecular entre a cadeia leve 1A/1B 3 (LC3) recrutada nas membranas do ER e os componentes microbianos ubiquinados,

promovendo sua inclusão nos autofagossomos de moléculas-alvo. A fusão subsequente de autofagossomos com lisossomas leva à degradação do patógeno e à eliminação direta. Essas vesículas contendo peptídeos antigênicos exógenos, derivados da degradação do lisossomo, fundem-se com compartimentos de carga do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). Após o carregamento no MHC-II, os peptídeos são transportados para a superfície celular de modo a induzir a estimulação de uma resposta imunitária adaptativa anti-viral de células TCD4+.....

97

Figura 3 - O papel da autofagia na regulação de respostas inflamatórias contra patógenos invasores. Padrões moleculares associados a patógenos microbianos (PAMPs) são reconhecidos por receptores toll-like (TLRs) localizados na membrana plasmática ou em compartimentos endossomais (1). O reconhecimento de TLRs ativados pelas proteínas adaptadoras Myd88 ou TRIF (2), ativa as vias de sinalização de TLR (3), envolvidas na ativação dos fatores de transcrição Nf-KB, IRF3/7 e API-1, que então translocam para o núcleo induzindo a transcrição de citocinas INF e pró-inflamatórias (4). A promoção da formação de autofagossomos é induzida de maneira dependente de Myd88 ou TRIF (5), e leva à regulação da ativação e secreção de inflamassomas de citocinas pró-inflamatórias, através de mecanismos que permanecem não completamente compreendidos (6), e entrega de PAMPs a vesículas contendo TLR para limitar a replicação viral (7). Além de promover atividades pró-inflamatórias, a autofagia também serve como um impedimento para a magnitude da

reação antiviral do hospedeiro. De fato, proteínas relacionadas à autofagia (Atg12 e Atg5) podem servir como um intervalo para a resposta pró-inflamatória induzida por TLRs (8).....

99

Figura 4 - Desregulação da autofagia durante a infecção pelo vírus da Dengue. Durante a infecção pelo DENV, a autofagia tem atividade pró-viral. A indução da autofagia pelo DENV (1) eleva a formação de autofagossomos (2), que se fundem com endossomos para formar anfisomes (3), compartimentos induzidos pelo vírus nos quais o DENV se replica ativamente (4). Autofagossomos acumulados estimulam o metabolismo lipídico (5), levando à liberação de ácidos graxos e energia para sustentar a replicação viral (6).....

102

Figura 5 - Desregulação da autofagia durante a infecção pelo ZIKV. Após a internalização do ZIKV, a liberação de material genômico dos endossomos e a tradução do RNA viral (1), NS4A e NS4B facilitam a curvatura das membranas do ER para promover a montagem de partículas virais imaturas (2) e inativar a via mTORC (3), limitando a fosforilação de Akt, induzindo, assim, autofagia (5). A regulação positiva na formação de autofagossomo (5) ativa a autofagia secretora (6) com liberação subsequente de partículas maduras do ZIKV (7).....

103

Figura 6 - Papel da autofagia na infecção pelo ZIKV. O mecanismo de entrada do ZIKV é mediado por uma grande variedade de receptores. Após a fusão da membrana, o material genético viral é liberado no citoplasma e traduzido em proteínas. A formação de pacotes de vesículas causa

estresse do ER e desencadeia autofagia. A cloroquina age aumentando o pH dentro dos endossomos, inibindo assim a fusão da membrana e a exocitose pela autofagia secretora.....

105

Figura 7 - Testes de compostos e desenvolvimento de drogas para limitar a autofagia: uma possível abordagem para combate a infecção pelo ZIKV. Compostos diferentes possuem a capacidade de modular passos cruciais para a progressão da autofagia. Considerando o papel fundamental da autofagia na promoção da replicação viral e no avanço da infecção, o teste de moléculas conhecidas por atuarem na autofagia pode ser essencial para identificar e selecionar candidatos para testar a atividade anti-ZIKV.....

108

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Energia livre de ligação (kcal/mol) de complexos proteína-ligante entre famílias de receptores celulares (receptores de fosfatidilserina e receptores de lectina do tipo C) e seus respectivos ligantes virais (fosfatidilserina e NAG).....	68
Tabela 2 - Estabilidade dos complexos proteína-proteína entre CRLs e proteínas E e prM glicosiladas com uma molécula de NAG cada.....	72
Tabela 3 - Valores médios de CT e fold change de expressão do ZIKV para amostras de sobrenadante e lisado celular de células U87-MG nos grupos controle e tratamento com inibidor de furina em diferentes concentrações (25 e 75µM) e MOI (1 e 4,5).....	75

Artigo 1

Tabela 1 - Estruturas PDB usadas para analisar o impacto de mutações não sinônimas em proteínas ZIKV usando o servidor MAESTROweb. Usamos uma sequência do ZIKV do Uniprot (Consortium, 2017) como genoma de referência.....	65
Tabela 2 - Variantes encontradas em sequências de cepas circulantes de ZIKV disponíveis no GenBank que causam grande impacto nas proteínas do ZIKV.....	66

Artigo 2

Tabela 1 - Lista de potenciais inibidores de estágio inicial na infecção por ZIKV.....	91
--	----

LISTA DE SIGLAS

ZIKV	Vírus zika
RNA	Ácido ribonucleico
C	Proteína estrutural do capsídeo
prM	Proteína estrutural da membrana
E	Proteína estrutural do envelope
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2 A
NS2B	Proteína não-estrutural 2 B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4 A
NS4B	Proteína não-estrutural 4 B
NS5	Proteína não-estrutural 5
DC-SIGN	Proteína não-integrina de captura intercelular específica de célula dendrítica
L-SIGN	Ligante de molécula de adesão intercelular não-integrina específica de fígado/linfonodo
MMR	Receptor de manose
CLEC5A	Membro a da família do domínio da lectina tipo C 5
TIM1	Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T tipo 1
TIM3	Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T tipo 3
TIM4	Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T tipo 4
TAM	Família de receptores de tirosina-quinase, constituída das moléculas Ty ro3, A xl e M er
TYRO3	Receptor de proteína tirosina quinase 3
AXL	Receptor de proteína tirosina quinase, do grego “anexelekto”, ou “descontrolado”
MER	Protooncogene tirosina quinase
GAS6	Proteína específica de parada do crescimento 6
PROS	Proteína S
prM	Proteína de membrana viral
CLR	Receptores de lectina do tipo C

PS	Fosfatidilserina
DENV	Vírus da dengue
prM-E	Complexo da proteína de membrana viral e a proteína viral E
CHIKV	Vírus da chikungunya
WNV	Vírus do oeste do Nilo
JEV	Vírus da encefalite japonesa
YFV	Vírus da febre amarela
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapato
MVEV	Vírus da encefalite Murray Valley
SLEV	Vírus da encefalite St. Louis
NCR	Região não-codificante
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
MTase	Domínio N-terminal da metiltransferase
RdPd	Domínio C-terminal RNA-polimerase dependente de Ma
Asn154	Resíduo de asparagina localizado na posição 154
N-X-T/S	Motivo de glicosilação altamente conservado de sequência N-X-T/S, onde N é asparagina, T é treonina e X é qualquer aminoácido padrão, exceto a prolina
E-stem	Domínio transmembranar da haste
DI	Domínio I
DII	Domínio II
DIII	Domínio III
FL	Looping de fusão
N154	Local de nitrogênio-glicosilação
TM	Transmembrana
E-M	Dímero da proteína e com a proteína M
E-TM	Domínio transmembranar da proteína E
M-TM	Domínio transmembranar da proteína M
TRL3	Receptor toll-like 3
RIG-I	Gene indutor do ácido retinóico 1
MDAS	Proteína associada à diferenciação de melanoma
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta

pH	Potencial hidrogeniônico
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CDR	Domínio de reconhecimento de carboidrato
DC	Célula dendrítica
DK	Domínio de kinase
FNIID	Domínio de fibronectina tipo 3
TAA	Tríade de aminoácidos ácidos
DM	Motivo dileucina
CD209	Gene da proteína DC-SIGN
RE	Retículo endoplasmático
FDA	Food and drug administration
CG	Complexo de Golgi
sE	Estrutura em dímero da proteína e
MOI	Multiplicidade de infecção
PBS	Tampão salina-fosfato
NAG	N-acetilglicosamina
FBS	Soro fetal bovino
CO ₂	Dióxido de carbono
GROMACS	Groningen machine for chemical simulations
CHARMM	Chemistry at harvard macromolecular mechanics
RMSD	Padrões de desvio médio quadrático
SASA	Área superficial acessível ao solvente
RMSF	Flutuação quadrática média da raiz
NCBI	National center for biotechnology information
R-X-R/K-R	Motivo de glicosilação altamente conservado de sequência R-X-R/K-R, onde R é arginina, K é lisina e X é qualquer aminoácido padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	HIPÓTESE	25
1.2	OBJETIVOS	25
1.2.1	Objetivo Geral	25
1.2.2	Objetivos Específicos	26
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1	ARBOVIROSES: VETORES, IMPLICAÇÕES SANITÁRIAS E CENÁRIO ATUAL	27
2.2	FLAVIVIRUS	28
2.3	O VÍRUS ZIKA	28
2.4	CURSO DA INFECÇÃO E SINTOMAS	31
2.5	DESORDENS NEUROLÓGICAS E A SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA.....	33
2.6	VIAS DE ENTRADA DO ZIKV EM CÉLULAS.....	35
2.6.1	Receptores de Lectinas do Tipo C	36
2.6.2	Receptores de Fosfatidilserina	38
2.6.3	Perspectivas no desenvolvimento de fármacos	40
2.7	PAPEL DA MATURAÇÃO VIRAL NA INFECTIVIDADE DO ZIKV.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1	DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	44
3.2	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO.....	45
3.3	DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR	45
3.3.1	Preparação de ligantes e receptores	46
3.3.2	Modelagem molecular da proteína prM	47
3.4	CULTIVO, INFECÇÃO E PROCESSAMENTO DE CÉLULAS	47
3.4.1	Expansão celular da linhagem U87-MG	47

3.4.2	Expansão da cepa viral ZIKV PE243	47
3.4.3	Titulação viral por Tissue Culture Infective Dose 50% (TCID50)	48
3.4.4	Ensaio <i>in vitro</i> da maturação da partícula viral e infectividade	49
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	MUTACIONAL LANDSCAPE OF ZIKA VIRUS STRAINS WORLDWIDE AND ITS STRUCTURAL IMPACT ON PROTEINS	52
4.2	DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR	68
4.3	ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA MATURAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL E INFECTIVIDADE	74
5	CONCLUSÕES	77
6	ASPECTOS ÉTICOS	78
7	FONTES DE FINANCIAMENTO	79
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION	86
	APÊNDICE B ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCE	94
	ANEXO A PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	115

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus de RNA fita simples, envelopado, do gênero *Flavivirus*, transmitido por mosquitos *Aedes* (ROUTHU; BYRAREDDY, 2017; YUN; LEE, 2017). Embora tenha sido descoberto na África, em 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MERFELD et al., 2017), o ZIKV ganhou atenção mundial recentemente, após um surto nas Américas, onde foi associado com defeitos congênitos graves, incluindo microcefalia (OLIVEIRA et al., 2017; SCHULER-FACCINI et al., 2016).

O genoma do ZIKV consiste de uma molécula de RNA de sentido positivo de ~11kb que codifica três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (5'-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3') (MEERTENS et al., 2017; PERERA-LECOIN et al., 2014).

A entrada de *Flavivirus* em suas células-alvo é mediada principalmente pela interação de N-glicanos (ligados à proteína de envelope E) com receptores de superfície celular (HASAN et al., 2017; PERERA-LECOIN et al., 2014), embora alguns estudos recentes tenham considerado a prM como uma possível proteína de entrada em partículas virais imaturas (REY; STIASNY; HEINZ, 2017; YUAN et al., 2017). Dentre esses receptores celulares, estão os receptores de lectina do tipo C (C-type Lectin Receptors, ou CLRs), como DC-SIGN (Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin), L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin), MMR (Mannose receptor) e CLEC5A (C-type lectin domain family 5 member A) (HASAN et al., 2017; LOZACH et al., 2007; SMIT et al., 2011; ZELENSKY; GREARY, 2005). Estudos recentes realizados com diferentes *Flavivirus*, entretanto, demonstram que a entrada viral também pode ser mediada pela fosfatidilserina (PS) (adquirida durante a maturação viral e presente na membrana viral) e receptores de PS (presentes na membrana das células hospedeiras), processo denominado "mimetismo apoptótico" (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; HAMEL et al., 2015; MERCER; HELENIUS, 2010; REY; STIASNY; HEINZ, 2017). Esses receptores de PS pertencem a duas famílias de proteínas: TIM (T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain: TIM1, TIM3 e TIM4) e TAM (TYRO3, AXL e MER) (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; KAY et al., 2012; LEMKE; ROTHLIN, 2010; MEERTENS et al., 2017). O papel dos receptores de fosfatidilserina na entrada de *Flavivirus* em células foi identificado pela primeira vez em estudos com o vírus da

Dengue (DENV), mas evidências sugerem que o ZIKV também pode usar mimetismo apoptótico para infectar diferentes tecidos, incluindo células da pele, células endoteliais, células neurais e células da placenta (LIU et al., 2016; RETALLACK et al., 2016; TABATA et al., 2016; TANG et al., 2016; WELLS et al., 2016).

O processo de maturação do ZIKV ocorre no complex de Golgi (CG), onde a protease do hospedeiro furina cliva a proteína prM de partículas imaturas (C, prM e E), dissociando a porção pr da partícula viral e liberando partículas maduras (C, M e E) (HEINZ; STIASNY, 2012). Evidências indicam que, em alguns casos, o processo clivagem é incompleto, o que leva à reorganização inadequada da proteína E e consequente exposição da membrana viral, que contém prM e PS (REY; STIASNY; HEINZ, 2017). Isso culmina com a liberação de partículas virais parcialmente maduras exibindo não apenas proteína E, mas também prM e PS, o que poderia contribuir para uma gama mais ampla de células suscetíveis ao ZIKV.

Desta forma, estudos que elucidem as formas de entrada do ZIKV em células, tal como que analisem os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatogenia desta doença, se tornam imprescindíveis para o desenvolvimento de formas de profilaxia e tratamento contra essa arbovirose.

1.1 HIPÓTESE

A liberação de partículas virais parcialmente maduras, expondo na superfície não apenas proteína E, mas também fosfatidilserina e proteína prM, aumenta o potencial de infectividade do vírus Zika, principalmente em células cerebrais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Investigar *in silico* as vias de entrada do ZIKV em células e *in vitro* o papel da maturação da partícula viral nestes mecanismos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Investigar *in silico* sequências completas de aminoácidos do ZIKV disponíveis no GenBank (NCBI), buscando por mutações não-sinônimas (presentes em cepas circulantes) possivelmente envolvidas em mecanismos evolutivos virais relacionados com a capacidade do ZIKV de infectar de células neuronais e inferir o impacto destas mutações não-sinônimas nas proteínas virais;
- Avaliar *in silico*, através de docking molecular, as interações moleculares entre as proteínas virais de entrada em células (prM e E) e o ligante viral de entrada (PS) com seus respectivos receptores celulares: CLRs e receptores de PS (famílias TAM e TIM), objetivando identificar as rotas de entrada preferíveis pelo ZIKV e relacionando os resultados com os diferentes tipos celulares que o vírus infecta;
- Avaliar *in silico*, através de dinâmica molecular, a estabilidade das ligações entre o ligante viral PS e os receptores celulares das famílias TAM e TIM, objetivando identificar as ligações mais prováveis de serem utilizadas pelo ZIKV e relacionando os resultados com os diferentes tipos celulares que o vírus infecta;
- Estudar *in vitro* a influência da maturação das partículas virais da cepa viral pernambucana ZIKV PE243 na infectividade de células humanas gliais estabelecidas (U87-MG).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARBOVIROSES: VETORES, IMPLICAÇÕES SANITÁRIAS E CENÁRIO ATUAL

Arboviroses são viroses transmitidas por vetores artrópodes hematófagos (mosquitos, moscas e carrapatos) para e entre hospedeiros vertebrados. Vírus como DENV, ZIKV, Chikungunya (CHIKV), da febre do Nilo Ocidental (WNV) e outros, infectam milhões de pessoas todos anos em diversas partes do mundo (BHATT et al., 2013; CHANCEY et al., 2015; WEAVER; FORRESTER, 2015).

Os arbovírus se replicam no vetor artrópode antes da transmissão. A transmissão biológica pode se dar (1): verticalmente, envolvendo a passagem do vírus a partir de um vetor fêmea infectado para seus descendentes; ou (2): horizontalmente, a partir de contato sexual entre um macho verticalmente infectado diretamente a um vetor do sexo feminino, ou por via oral, de um vetor a um hospedeiro vertebrado através da saliva durante repasto sanguíneo (WEAVER; FORRESTER, 2015; WEAVER; REISEN, 2010).

A transmissão horizontal é a mais comum para a maioria dos arbovírus e envolve, primeiramente, a infecção do trato digestivo do vetor durante o repasto com sangue infectado. Após infecção, ocorre a disseminação e eventual replicação viral nas glândulas salivares, seguida pela injeção de saliva infectante no hospedeiro vertebrado durante um segundo repasto sanguíneo (WEAVER; FORRESTER, 2015; WEAVER; REISEN, 2010).

O número aumentado de viagens turísticas e comerciais adivindas com a globalização, juntamente com o crescimento desordenados das cidades e as mudanças ambientais em curso no planeta têm apresentado um impacto significativo sobre a transmissão de inúmeras arboviroses nos últimos anos (ARAÚJO et al., 2015; MARCONDES; XIMENES, 2016).

No início de 2015, um surto de ZIKV foi identificado no nordeste do Brasil, área onde o DENV também circula. No mesmo ano (setembro), relatos de um aumento do número de crianças nascidas com microcefalia em áreas afetadas pelo vírus começaram a surgir, e o RNA viral foi identificado no líquido amniótico de duas mulheres cujos fetos tinham sido diagnosticados por ultrassonografia com microcefalia no pré-natal (SCHULER-FACCINI et al., 2016).

Além desta complicação, foi observado o desenvolvimento de síndrome Guillain-Barré em adultos e outras desordens neurológicas nos fetos, como presença de

calcificações no parênquima periventricular e regiões do tálamo, ventriculomegalia, lisencefalia e paquigiria, sugerindo a presença de migração celular anormal no primeiro trimestre gestacional (CHANG et al., 2016; SOLOMON; BAYLIS; BROWN, 2016; ZANLUCA et al., 2015).

2.2 FLAVIVIRUS

A família *Flaviviridae* é constituída por vírus envelopados de RNA com sentido positivo, o qual pode ser diretamente transcrito em proteína. Essa família é formada por três gêneros: *Flavivirus* (do latim "flavus", que quer dizer "amarelo"), *Pestivirus* (do latim "pestis", que quer dizer "praga") e *Hepacivirus* (do grego "hepar", que quer dizer "fígado") (SMIT et al., 2011).

O gênero *Flavivirus* contém mais de 65 espécies, que compartilham similaridades de morfologia, organização genômica e estratégia de replicação. Estes incluem WNV, DENV, vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV), vírus da encefalite do Murray Valley (MVEV), vírus da encefalite St. Louis (SLEV) e o ZIKV (CHOUMET; DESPRÈS, 2015; SMIT et al., 2011).

2.3 O VÍRUS ZIKA

O ZIKV é um vírus envelopado de RNA fita única de sentido positivo, e foi primeiramente identificado em 1947, na floresta de Zika (Kampala, Uganda), em macacos Rhesus (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; DUAN et al., 2017; MUSSO, 2015). Possui duas linhagens: a asiática e a africana. Supõe-se que, na África, o vírus tenha sido mantido em um ciclo de transmissão entre primatas não-humanos (macacos e chimpanzés) e mosquitos, sendo os humanos hospedeiros ocasionais acidentais (HADDOW et al., 1964). Em áreas fora da África, entretanto, humanos têm se tornado hospedeiros principais (DUFFY et al., 2009).

Entre o primeiro isolamento de ZIKV em macacos em 1947 até 2007, os relatos de casos em humanos foram raros e esporádicos (KUNO; CHANG, 2007). Evidências dessas infecções foram baseadas principalmente em estudos sorológicos e, em alguns casos, isolamento do vírus. O isolamento viral sugeriu uma ampla distribuição na África e no sudeste asiático, embora nenhuma epidemia tenha sido observada

(MACNAMARA, 1954).

Os genomas sequenciados na epidemia sulamericana e as análises filogenéticas apresentaram 99,7% e 99,9% de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos com a linhagem circulante na Polinésia Francesa em 2013 (CAMPO et al., 2017; ENFISSI et al., 2016). Esse achado é consistente com as análises das sequências dos genes do envelope viral encontrados em pacientes brasileiros (CALVET et al., 2016).

O genoma do ZIKV possui 10.794 nucleotídeos, que codificam 3.423 aminoácidos, com duas regiões flanqueadoras não-codificantes (5' e 3' NCR) e uma estrutura longa única codificando uma poliproteína, a qual é clivada em proteína de capsídeo (C), proteína precursora de membrana (prM), proteína de envelope (E) e 7 proteínas não-estruturais (NS): 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (**Figura 1**). A partícula viral tem um diâmetro de ~50nm e contém um nucleocapsídeo cercado por uma bicamada lipídica contendo as proteínas estruturais (prM/M e E), as quais são dispostas em simetria icosaédrica na superfície do vírus (DUAN et al., 2017; WANG et al., 2017). As proteínas estruturais formam a partícula viral, enquanto as proteínas não-estruturais desempenham funções essenciais na replicação do genoma, no processamento de poliproteínas e na manipulação das respostas do hospedeiro (FAYE et al., 2014; GODOY et al., 2017).

Ensaio de RT-PCR usando primers direcionados para os genes E e NS5 têm sido uma ferramenta laboratorial importante para diagnóstico nos recentes surtos (DUFFY et al., 2009; MEERTENS et al., 2017).

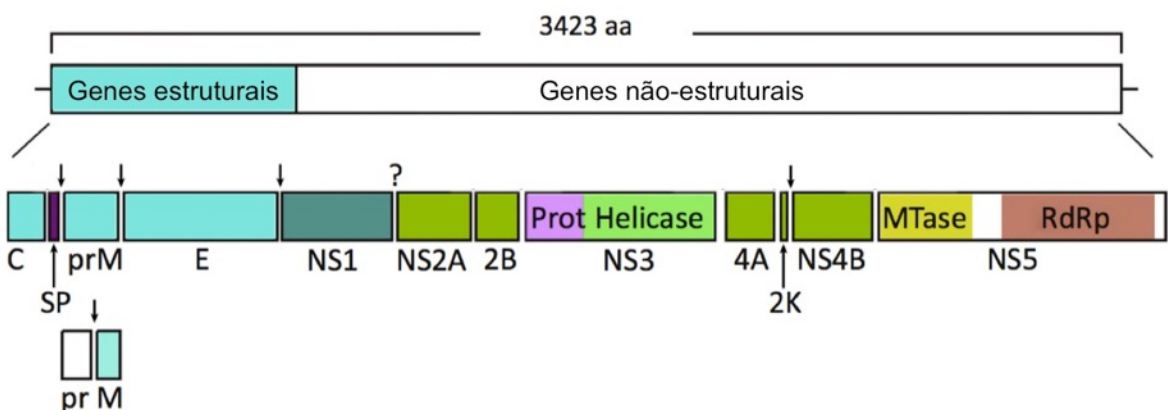


Figura 1. O ZIKV possui um genoma de sentido positivo de cadeia simples de aproximadamente 11kb que codifica as proteínas estruturas (C, prM e E) e não-estruturais (5'-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'). As caixas abaixo do genoma indicam precursores e proteínas maduras geradas pela cascata de processamento proteolítico. A NS1 é necessária para replicação viral e infecção.

Semelhante a outros *Flavivirus*, a proteína NS3 contém dois domínios funcionais: o domínio de protease e o domínio de helicase. De igual forma, a NS5 possui dois domínios, os quais são essenciais para a replicação do genoma: o domínio N-terminal da metiltransferase (MTase), responsável pela estrutura cap 5' do genoma viral, a qual garante uma tradução estável e eficiente e evasão da resposta imune do hospedeiro; e o domínio C-terminal RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), que é responsável pelo processo de replicação do genoma. A importância da NS5 na replicação viral e na modulação da resposta imune do hospedeiro a torna um alvo atraente para o desenvolvimento drogas antivirais. Fonte: Adaptado de (DAI et al., 2016).

A proteína E é a maior proteína de superfície viral, estando envolvida nos processos de ligação e fusão da membrana (HASAN et al., 2017; SHI; GAO, 2017). Na maioria dos *Flavivirus* a proteína E é N-glicosilada após o processo de tradução, no aminoácido Asn154 (asparagina, na posição 154), dentro de um motivo de glicosilação altamente conservado de sequência N-X-T/S (onde N é asparagina, T é treonina e X é qualquer aminoácido padrão, exceto a prolina) nas posições 154-156, indicando a importância biológica desta modificação. No entanto, alguns isolados de *Flavivirus* não apresentam essa glicosilação, sugerindo que a função da proteína E pode ser alcançada sem o N-glicano (ADAMS et al., 1995; BEASLEY et al., 2004; FONTES-GARFIAS et al., 2017).

Semelhante a outros *Flavivirus*, a proteína E do ZIKV possui quatro domínios: o domínio transmembranar da haste (E-stem), que é responsável pelo ancoramento à membrana; e os domínios I, II e III, que constituem a parte superficial predominantemente fita β da proteína (PERERA-LECOIN et al., 2014).

O domínio I (DI) da proteína E atua como uma ponte entre os domínios II (DII) e III (DIII) (**Figura 2A**). A ponta do DII contém o looping de fusão (FL), que interage com a membrana do hospedeiro durante a fusão membranar. Na maioria dos *Flavivirus*, é no DIII se que localiza o sítio de ligação ao receptor, sendo de grande importância no processo de fusão. Curiosamente, o ZIKV tem um único local de glicosilação (N154) no DI da proteína E (**Figura 2B**), evidenciado na superfície, por possuir um "loop" mais longo (resíduos 145-160) em comparação com outros *Flavivirus*, como DENV. Dado que DC-SIGN e MMR são prováveis receptores/co-receptores de DENV que se ligam a glicanos, a glicosilação N154 pode funcionar como fator de anexo do vírus às células hospedeiras. Esta região de "loop 150" varia não apenas entre cepas do ZIKV, mas também em outros *Flavivirus*, o que sugere que variações nesta região influenciam na infectividade viral (SHI; GAO, 2017).

A recente propagação da linhagem asiática do ZIKV à Oceania e às Américas,

pode estar associada à adaptação da proteína NS1, que pode facilitar a replicação viral. Mutações nos genes das proteínas prM e NS1 demonstraram contribuir pra maior infectibilidade viral (XIA et al., 2018; YUAN et al., 2017).

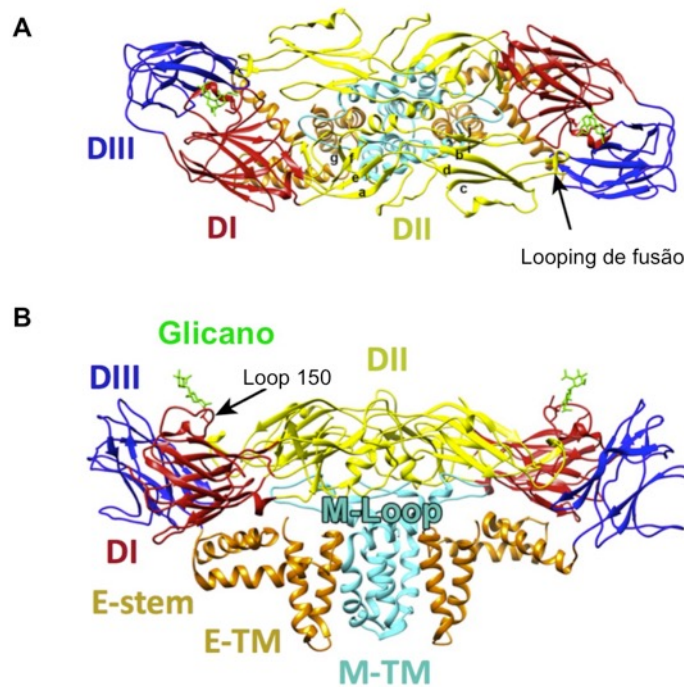


Figura 2. (A) Dímero da proteína E. O código de cores segue a designação padrão de domínios da proteína: I (vermelho), II (amarelo) e III (azul). Os resíduos subjacentes da haste e da transmembrana (TM) são mostrados (laranja). O glicano ligado ao resíduo Asn154 é mostrado em verde. (B) Vista lateral do dímero E-M, mostrando os ectodomínios E (DI, DII e DIII), bem como os domínios transmembranares E-stem e E-TM (laranja). Os domínios transmembranares M-TM e M-loop estão evidenciados em ciano. Os domínios E-TM e M-TM são encontrados mergulhados dentro da bicamada lipídica. O resíduo de glicosilação Asn154 é localizado no DI, e o glicano pode ser visto representado em verde. Fonte: Adaptado de (SHI; GAO, 2017).

2.4 CURSO DA INFECÇÃO E SINTOMAS

Quando o mosquito *Aedes* pica um indivíduo infectado, ele ingere sangue contendo ZIKV. Como outros Flavivirus, o ZIKV se replica nas células epiteliais do intestino do mosquito e, subsequentemente, nas células das glândulas salivares. Após um período de incubação extrínseca (entre cinco e dez dias), o ZIKV pode ser encontrado na saliva do mosquito, que então poderá infectar humanos (HAMEL et al., 2015).

Quando a saliva infectada do mosquito é inoculada em humanos, o vírus pode infectar os queratinócitos epidermais, fibroblastos da camada subcutânea e células de Langerhans. Os queratinócitos e fibroblastos contêm AXL, Tyro3 e TIM-1, que servem como fatores de ligação ou receptores para o ZIKV. Por outro lado, as células de Langerhans contêm DC-SIGN, que serve como receptor de entrada do vírus (HAMEL et al., 2015; LOZACH et al., 2007; MEERTENS et al., 2017).

A infecção por ZIKV nos fibroblastos está associada à alta expressão de TLR3 (Toll-like receptor 3), RIG-I (Retinoic acid-inducible gene I) e MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5), seguida pela expressão aumentada de interferons alfa (IFN- α) e beta (IFN- β), e as suas vias da ativação imunológica, podendo assim, suprimir a carga viral das células infectadas. Após a replicação em células de tecidos locais e nos nódulos linfáticos regionais, o ZIKV pode se difundir a partir dos vasos linfáticos para outros órgãos/tecidos, incluindo o sistema nervoso central, músculos esqueléticos, miocárdio, via corrente sanguínea; e ser transmitido para o feto, verticalmente (CARNEIRO; TRAVASSOS, 2016; CHAN et al., 2016).

A infecção por ZIKV em ratos lactentes se mostrou altamente neurotrópica. Exames histopatológicos revelaram que cérebros de ratos lactentes infectados apresentam degeneração neuronal e infiltração celular com sítios de replicação viral em células gliais e neurônios (CARNEIRO; TRAVASSOS, 2016; CHAN et al., 2016).

Aproximadamente, 80% das infecções pelo ZIKV podem ser subclínicas ou causar uma doença suave, depois de um período de incubação de 3 a 12 dias. Os sintomas duram de dois a sete dias e incluem: febre baixa (37,8 - 38,5°C), rash cutâneo, dor de cabeça retro-orbital, conjuntivite não purulenta bilateral, mialgia, e artrite/artralgia com edema periarticular das pequenas articulações das mãos e dos pés (CHAN et al., 2016). O rash cutâneo é descrito como generalizado, eritematoso, de erupção maculopapular que se espalha do rosto para os demais membros (MUSSO, 2015).

Em menor frequência, alguns pacientes podem apresentar sintomas sistêmicos mais proeminentes (febre alta, arrepios, calafrios, dor de garganta, hipotensão e adenopatias cervical, submandibular, axilar e/ou inguinais), sintomas do trato digestivo (náuseas, vômitos, diarreia, constipação, dor abdominal e úlceras aftosas), sintomas do trato geniturinário (hematúria, disúria, dor perineal, e hematospermia, muitas vezes têm RNA viral detectável ou partículas infecciosas de vírus na urina e/ou sêmem) (SCHAFFNER; FONTENILLE; MATHIS, 2014).

De forma geral, parâmetros laboratoriais hematológicos e bioquímicos se mostram normais durante a infecção. No entanto, alguns pacientes podem ter leucopenia moderada e transiente, neutropenia, linfopenia ou linfócitos ativados, monocitose e trombocitopenia, além de níveis séricos elevados de lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, γ -glutamyl transferase, fibrinogênio, ferritina, proteína reativa C e taxa de sedimentação de eritrócitos, durante a fase virêmica (ALAM et al., 2017; MUSSO et al., 2015).

A recuperação da infecção ZIKV está relacionada com a restauração do número normal de células imunológicas periféricas e a com a função normal das células apresentadoras de antígenos. Notavelmente, as manifestações clínicas da febre Zika não são específicas, podendo ser observadas em outras doenças causadas por arbovírus, especialmente DENV e CHIKV (NHAN; MUSSO, 2015).

2.5 DESORDENS NEUROLÓGICAS E A SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA

Uma possível associação entre a infecção por ZIKV e complicações severas neurológicas foi levantada durante as epidemias recentes na Oceania e na América do Sul, onde a incidência da síndrome de Guillain-Barré aumentou de 8 a 20 vezes em alguns países (OEHLER et al., 2014; RUSSO; JUNGSMANN; BELTRÃO-BRAGA, 2017).

Setenta e quatro dos 8.750 (0,8%) pacientes com suspeita de Zika no surto da Polinésia Francesa desenvolveram síndromes neurológicas após apresentar quadro da doença. Quarenta e dois desses 74 (56,8%) pacientes foram diagnosticados com síndrome de Guillain-Barré. Similarmente, relatos de síndrome de Guillain-Barré têm sido reportados em pacientes infectados pelo ZIKV na América do Sul (ECDC, 2015). Outras complicações neurológicas estão também potencialmente ligadas à infecção por ZIKV, incluindo encefalite, meningoencefalite, mielite, parestesia, vertigem, paralisia facial, manifestações oftalmológicas (fotofobia e iridociclite hipertensiva) e auditivas (RUSSO; JUNGSMANN; BELTRÃO-BRAGA, 2017).

Microcefalia (perímetro cefálico igual ou maior que 2 desvios-padrão abaixo da média para sexo e idade gestacional no nascimento) é o relato clínico mais comum na síndrome da Zika congênita (MLAKAR et al., 2016). Além da microcefalia, neonatos e fetos com suspeita de infecção congênita por ZIKV têm tido também outras malformações. Características gerais incluem baixo peso ao nascer, pele do couro

cabeludo em excesso, anasarca, polidrâmnio e artrogripose (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Anormalidades neurológicas incluem lesão cerebral, síndrome de polimalformação, disfunções no tronco cerebral e ausência de deglutição (PAHO/WHO, 2015). Problemas oftalmológicos incluem catarata, formato assimétrico dos olhos, calcificações intra-oculares, atrofia macular (unilateral, atrofia macular bem definida e/ou manchas de pigmento macular e perda de reflexo foveal), hipoplasia do nervo ótico, coloboma da íris e subluxação do cristalino (DE PAULA FREITAS et al., 2017; RUSSO; JUNGSMANN; BELTRÃO-BRAGA, 2017). Notavelmente, outras características de infecções intrauterinas, como hepatoesplenomegalia, rash e coriorretinite, foram relatadas (SCHULER-FACCINI et al., 2016).

Partículas virais e de RNA do ZIKV podem ser detectadas em amostras de autópsia por microscopia eletrônica e RT-qPCR, respectivamente (MLAKAR et al., 2016). No começo do surto no Brasil, o RNA do ZIKV foi detectado por RT-qPCR no líquido amniótico de 2 mulheres grávidas, cujos fetos demonstraram evidências de microcefalia na ultrassonografia (BASARAB et al., 2016).

Desde o começo do surto no Brasil (em novembro de 2015) até novembro de 2018, foram notificados 16.900 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo ZIKV e outras etiologias infecciosas. Destes, 3.279 (19,4%) foram confirmados. Neste mesmo período, na região nordeste (que engloba os estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia) foram notificados 9.905 casos de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, tendo sido confirmados 2.079 casos. Em todo o Brasil, foram confirmados 351 óbitos por ZIKV, sendo 201 (57,2%) na região nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRAZIL), 2018).

Centrando-se nos pacientes mais afetados e no fato de que o período da infecção é um importante fator determinante na severidade das lesões fetais, é possível que os casos reportados de microcefalia representem apenas a ponta do iceberg. Infecção precoce que ocorra durante o primeiro ou até o segundo semestre podem estar associados com anormalidades congênitas ou até morte intrauterina (MLAKAR et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016). Sem dúvidas, dados preliminares sugerem um maior risco de desenvolvimento de anormalidades congênitas ou microcefalia no primeiro trimestre de gravidez. De 35 mães cujos filhos nasceram com microcefalia, 57% apresentaram rash durante o primeiro trimestre de

gravidez, e 14% durante o segundo. É possível que infecções intrauterinas que ocorram em um estágio tardio da gravidez, possam apresentar manifestações diferentes, como retardo mental, surdez neurossensorial e/ou lesões oftalmológicas (ECDC, 2016).

2.6 VIAS DE ENTRADA DO ZIKV EM CÉLULAS

A superfície do ZIKV é tipicamente coberta pela proteína de envelope (E). As interações individuais com receptores geralmente são fracas, mas o contato com múltiplos receptores torna a afixação alta e liga o vírus à célula de modo praticamente irreversível (MERCER; HELENIUS, 2010). A entrada de *Flavivirus* em suas células-alvo é mediada pela interação de N-glicanos, conjugados à proteína viral E, com receptores de superfície celular da célula hospedeira (HASAN et al., 2017; PERERA-LECOIN et al., 2014).

Após a ligação com receptores celulares, o ZIKV entra nas células hospedeiras por endocitose mediada por clatrina, proteína que desempenha importante função na formação de vesículas membranares. A endocitose é acompanhada por uma mudança na conformação do envelope, seguida por fusão da membrana e posterior liberação do genoma viral no citoplasma da célula. As partículas virais difundem-se ao longo da superfície celular em direção a um poço pré-existente revestido por clatrina. Desta forma, duas possibilidades são sugeridas: ou as partículas virais rolam sobre fatores de ligação distintos até se ligarem ao receptor de entrada (localizados em hotspots de clatrina na superfície celular), ou o complexo vírus-receptor, formado inicialmente, é transportado para um poço pré-existente revestido por clatrina. Neste ponto, é importante distinguir receptores de entrada - moléculas cujas interações resultam na absorção do vírus - de fatores de ligação, os quais apenas retêm partículas virais na superfície celular até que haja interação com um receptor de entrada. Posteriormente, o poço revestido com clatrina evolui e a invaginação na membrana plasmática é fechada por excisão de membrana mediada por dinamina para formar uma vesícula revestida com clatrina. A vesícula revestida com clatrina é transportada para longe da membrana plasmática e, após isso, o revestimento de clatrina é liberado da vesícula. Após a absorção mediada por clatrina, a vesícula endocítica que transporta o vírus é conduzida aos endossomos iniciais, os quais amadurecem em endossomos tardios. Em seguida, ocorre a fusão da membrana viral com a membrana do endossomo e o RNA viral é descarregado no citoplasma. A fusão

da membrana foi detectada em média de 10 a 13 minutos após o início da infecção (SMIT et al., 2011).

Apesar de extensas investigações, a identidade dos receptores celulares que medeiam a entrada e infecção de *Flavivirus* é, no momento, pouco conhecida. Um grande número de moléculas foi descrito como candidatos a receptores em diferentes tipos de células, mas seu papel preciso na endocitose viral permanece obscuro (PERERA-LECOIN et al., 2014).

2.6.1 Receptores de Lectinas do tipo C

O sistema imune inato é responsável pela primeira linha de defesa do organismo contra o ataque microbiano e é induzido pelo reconhecimento de componentes microbianos, conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (pathogen-associated molecular patterns, ou PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrão (pattern recognition receptors, ou PRRs). Os PAMPs são altamente conservados e geralmente únicos aos micróbios. Nos vírus, os PAMPs são reconhecidos principalmente por meio de seus ácidos nucleicos, como RNA de fita dupla ou RNA de fita simples, e DNA, embora as glicoproteínas do envelope também possam ser reconhecidas (HOVING et al., 2014).

Os receptores de lectina do tipo C compreendem uma grande família de receptores que se ligam a carboidratos, através de um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos (carbohydrate recognition domains, ou CRDs) (**Figura 3**). Vários membros desta família são altamente expressos em células mielóides, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas (dendritic cells, ou DCs) e, portanto, desempenham um papel central na ativação do sistema imune do hospedeiro (HOVING et al., 2014; KIM; LI; LINHARDT, 2017).

CLRs reconhecem perfis de carboidratos em agentes patogênicos e atuam como receptores de internalização desses agentes, encaminhando-os para endossomos, dando início ao processo de apresentação de antígenos e eliminação do patógeno (HOVING et al., 2014). Nesse aspecto, *Flavivirus* podem ter evoluído para explorar múltiplos CLRs para entrada e maior disseminação viral. Dentre eles, se sobressaem os receptores celulares DC-SIGN, L-SIGN, MMR e CLEC5A (KIM; LI; LINHARDT, 2017).

DC-SIGN e L-SIGN são CLRs transmembranares do tipo 2 (dependentes de cálcio). Seus domínios extracelulares compartilham motivos estruturais comuns,

incluindo um pescoço prolongado, composto de repetições em tandem de uma sequência de 23 aminoácidos altamente conservada, seguida por um CRD, que liga glicanos ricos em manose e desempenha um papel importante na ligação de Flavivirus e na infecção de células mieloides. DC-SIGN é altamente expresso em alguns subconjuntos de macrófagos e DCs imaturas, o que sugere uma possível facilitação na disseminação viral (HAMEL et al., 2015; KAY et al., 2012; SMIT et al., 2011). Por outro lado, a expressão de L-SIGN é restrita às células endoteliais (sinusoidais) do fígado e células endoteliais dos gânglios linfáticos. Apesar de evidências demonstrarem que células que expressam L-SIGN são infectadas *in vivo*, o papel da L-SIGN durante o curso da infecção natural em *Flavivirus* ainda não está claramente estabelecido (PERERA-LECOIN et al., 2014).

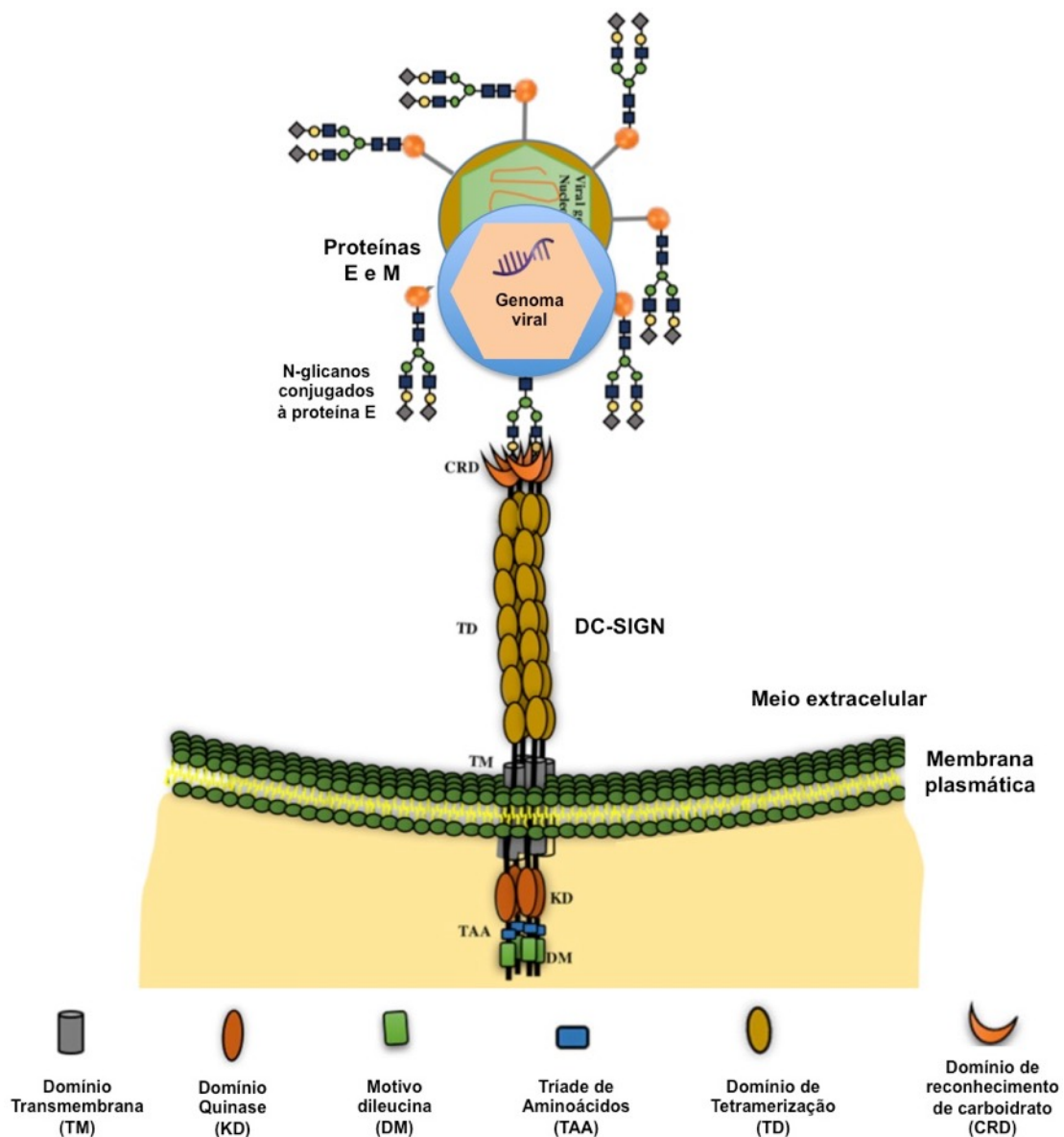


Figura 3. DC-SIGN é um receptor de lectina do tipo C conhecido por interagir com o Zika e outros *Flavivirus*, facilitando sua entrada nas células hospedeiras. O domínio transmembranar (TM), o domínio de quinase (KD), o domínio Ig, os domínios de fibronectina tipo 3 (FNIID), o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), a tríade de aminoácidos ácidos (TAA), a tetramerização domínio (TD) e motivo de dileucina (DM) são representados na figura, assim como o N-terminal e o C-terminal. Fonte: Adaptado de (ROUTHU; BYRAREDDY, 2017).

Estudos recentes identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único na região promotora do gene da DC-SIGN (*CD209*) que se mostra fortemente associado à predisposição a formas graves de febre hemorrágica da Dengue (BARKHASH et al., 2012; WANG et al., 2011), o que reforça o envolvimento desse receptor no tropismo de *Flavivirus*. DC-SIGN e L-SIGN ancorados à membrana celular interagem, através de seus domínios CRD, com carboidratos (N-glicanos) ligados à proteína viral E e têm se demonstrado capazes de promover a infecção de DENV e WNV *in vitro* (KIM; LI; LINHARDT, 2017).

MMR é outro CLR dependente de cálcio que foi proposto como receptor funcional de *Flavivirus* (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006). Ao contrário de DC-SIGN e de L-SIGN, MMR tem vários domínios CRD e um domínio rico em cisteína na extremidade do seu domínio extracelular que é capaz de interagir com açúcares sulfatados (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; HAMEL et al., 2015). MMR é essencialmente expresso em macrófagos, mas também pode ser encontrado em linfonodos e células endoteliais do fígado, em células renais e em algumas populações de DC - todas relevantes para a infecção por *Flavivirus*. Esse receptor demonstrou se ligar à proteína E dos quatro sorotipos de DENV e foi proposto como receptor de internalização para DENV em macrófagos primários humanos, uma vez que anticorpos policlonais anti-MMR inibem a infecção pelo vírus (DEJNIRATTISAI et al., 2016).

CLEC5A, que é expressa em monócitos e macrófagos, demonstrou mediar a entrada de DENV e JEV nas células. Ao contrário de outros CLRs, a sua ligação ocorre de forma não-dependente do cálcio (KIM; LI; LINHARDT, 2017).

2.6.2 Receptores de Fosfatidilserina

Estudos recentes com diferentes *Flavivirus* mostram de forma convincente que a entrada viral pode ser mediada por interações que não envolvem a proteína E, mas ocorrem entre lipídeos carregados negativamente, como a fosfatidilserina (PS),

presentes na membrana viral (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; HAMEL et al., 2015; HEINZ; STIASNY, 2017). Os receptores celulares lipídicos aniônicos pertencem a duas famílias distintas de receptores de fosfatidilserina transmembranares: TIM (*T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain*: TIM1, TIM 3 e TIM4) e TAM (TYRO3, AXL e MER) (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; KAY et al., 2012; LEMKE; ROTHLIN, 2010; MEERTENS et al., 2012, 2017). Contrariamente aos receptores TIM, os receptores TAM não se ligam diretamente à PS, mas indiretamente, através de um processo que requer a presença da proteína GAS6 (*Growth-arrest-specific 6*) ou da proteína S (PROS), dois ligantes naturais dos receptores TAM, que funcionam como moléculas intermediárias (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; LEMKE; ROTHLIN, 2010; MEERTENS et al., 2017). A função fisiológica desses receptores é reconhecer os lipídios carregados negativamente em células apoptóticas e desencadear endocitose por células fagocíticas (FAIRN et al., 2011; HAMEL et al., 2015; MERCER; HELENIUS, 2010). Este processo de “seqüestro” foi previamente identificado em um grande número de vírus e denominado “mimetismo apoptótico” (MERCER; HELENIUS, 2010).

À medida que *Flavivirus* brotam no lúmen do retículo endoplasmático (RE) durante a morfogênese, a membrana viral acaba refletindo a composição da membrana do RE, que possui PS em seu folheto luminal. A membrana plasmática das células vivas normalmente não contém lipídeos negativamente carregados no folheto externo, devido à presença de enzimas específicas denominadas “flipases lipídicas” que asseguram a assimetria da membrana plasmática ao manter esses lipídeos somente no folheto interno (FAIRN et al., 2011; KAY et al., 2012).

O papel dos receptores de fosfatidilserina na entrada de *Flavivirus* em células foi identificado pela primeira vez em estudos com DENV, mas várias evidências sugerem que o ZIKV também pode usar mimetismo apoptótico para infectar diferentes tecidos, incluindo células da pele, células endoteliais, células neurais e células da placenta (LIU et al., 2016; RETALLACK et al., 2016; TABATA et al., 2016; TANG et al., 2016; WELLS et al., 2016). Estudos recentes em camundongos com knock-out de receptores de TAM, no entanto, mostraram que essas moléculas não são necessárias para infectividade do vírus Zika, e a replicação do vírus não foi afetada no baço, placenta, vagina e cérebro (HASTINGS et al., 2017). Os dados corroboram com observações anteriores (GOVERO et al., 2016) e sugerem que pode haver redundância de receptores de entrada do ZIKV em células (KIM; LI; LINHARDT, 2017).

2.6.3 Perspectivas no desenvolvimento de fármacos

Desde que o surto de Zika aconteceu no Brasil, em 2015, a transmissão de ZIKV foi relatada em mais de 60 países e regiões do mundo. Embora 80% dos pacientes infectados sejam assintomáticos, a infecção por este *Flavivirus* pode causar microcefalia fetal em mulheres grávidas e aumentar o risco de distúrbios neurológicos e mielite em adultos infectados (ALAM et al., 2017; CAO et al., 2017; WALKER; THORNTON, 2016).

Até então, não foi aprovado nenhum agente antiviral específico contra qualquer *Flavivirus*, e o tratamento, quando aplicado, é geralmente direcionado ao alívio de sintomas, com analgésicos e antipiréticos. No entanto, ultimamente, tem havido um grande esforço na elaboração de ensaios com possíveis drogas candidatas direcionados para alvos virais (antivirais de ação direta) ou contra alvos celulares (MENÉNDEZ-ARIAS; D RICHMAN, 2014; SAIZ; MARTÍN-ACEBES, 2017).

Estudos recentes têm introduzido a idéia da reutilização de drogas, onde os medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) para atividade antiviral poderiam ser usados contra a infecção por ZIKV (NICOLA NOSENGO, 2016). A vantagem da reutilização de drogas em comparação com o desenvolvimento de drogas *de novo* em uma emergência pública é a rápida aplicação clínica. Esses medicamentos aprovados pela FDA estão emergindo como uma alternativa promissora para acelerar o desenvolvimento de drogas para doenças transmissíveis, como o vírus da hepatite C e o vírus Ebola (HE et al., 2015). Assim, a triagem sistemática de medicamentos aprovados pela FDA pode revelar novos agentes para o tratamento da infecção por ZIKV (ALAM et al., 2017; CAO et al., 2017; ROUTHU; BYRAREDDY, 2017).

Apesar dos avanços, a história bem sucedida de vacinas e terapias antivirais, a infecção por ZIKV ainda representa uma grande ameaça para a saúde humana. Desta forma, torna-se de extrema importância estudos aprofundados sobre a patogênese do ZIKV, bem como sobre suas formas de entrada em células, visto que essas proteínas de entrada são potenciais alvos no desenvolvimento de drogas.

2.7 PAPEL DA MATURAÇÃO VIRAL NA INFECTIVIDADE DO ZIKV

A maturação de partículas de *Flavivirus* de forma imatura (C, prM e E) para forma madura (C, M e E) ocorre durante a saída viral de uma célula infectada. As partículas

de vírus maduras contêm 180 cópias da proteína E e da proteína de membrana (M) no envelope e exibem um arranjo icosaédrico, no qual 90 E dímeros cobrem completamente a superfície viral (DOWD et al., 2014).

Durante a entrada na célula hospedeira, o ambiente endossomal ácido desencadeia uma alteração conformacional irreversível na proteína E e uma transição de uma formação de dímero para trímero, que leva ao evento de fusão de membrana (Figura 4) (YU et al., 2014). No RE, a partícula recém-montada imatura exibe uma superfície espinhosa, com 60 protrusões triméricas dos heterodímeros E-prM ancoradas. Durante a maturação do vírus, o baixo pH do interior do CG induz a reorganização dos heterodímeros E-prM em homodímeros E (YU et al., 2014). Este rearranjo estrutural expõe o local de clivagem da prM para ser digerida pela protease hospedeira, furina. A porção "pr" clivada da prM permanece associada ao vírus até a libertação da célula, onde finalmente se dissocia, devido ao pH neutro do espaço extracelular (ZHANG et al., 2007).

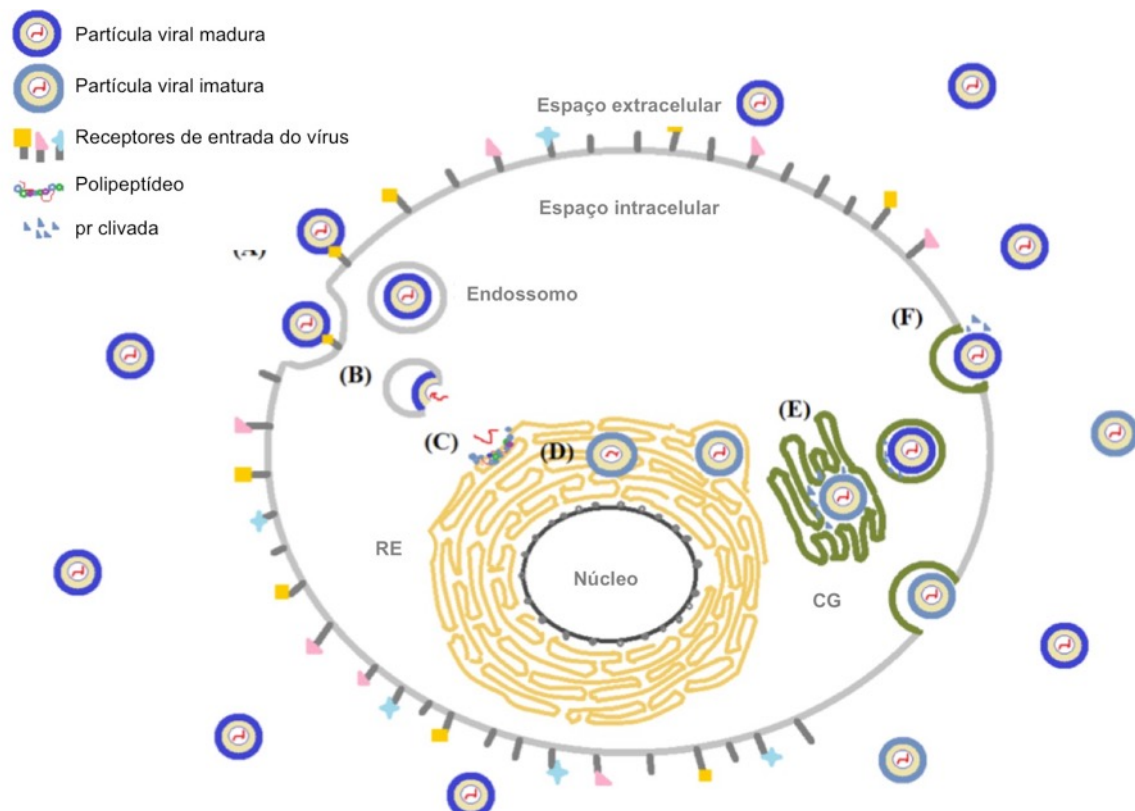


Figura 4. Entrada de *Flavivirus* na célula hospedeira. (A) Absorção e (B) internalização, com consequente mudança na conformação da proteína E, desencadeia a fusão da membrana e liberação do genoma viral; (C) replicação, (D) tradução e início do processo de glicosilação e montagem viral no RE; (E) clivagem da proteína prM no CG; (F) exocitose de partículas maduras e liberação da porção "pr". Fonte: Adaptado de (KIM; LI; LINHARDT, 2017).

Os vírus totalmente maduros incorporam proteínas E como 90 homodímeros, dispostos em uma configuração de espinha de peixe, e não possuem proteína prM não-clivada (DANG et al., 2016). Várias linhas de evidência indicam que a clivagem da prM pode ser ineficiente e que partículas virais infecciosas liberadas das células podem apresentar prM não-clivada. As partículas resultantes, portanto, exibem uma arquitetura heterogênea, expondo estrutura de partícula madura e de partícula imatura (**Figura 5**) (CHEN et al., 2016; DANG et al., 2016).

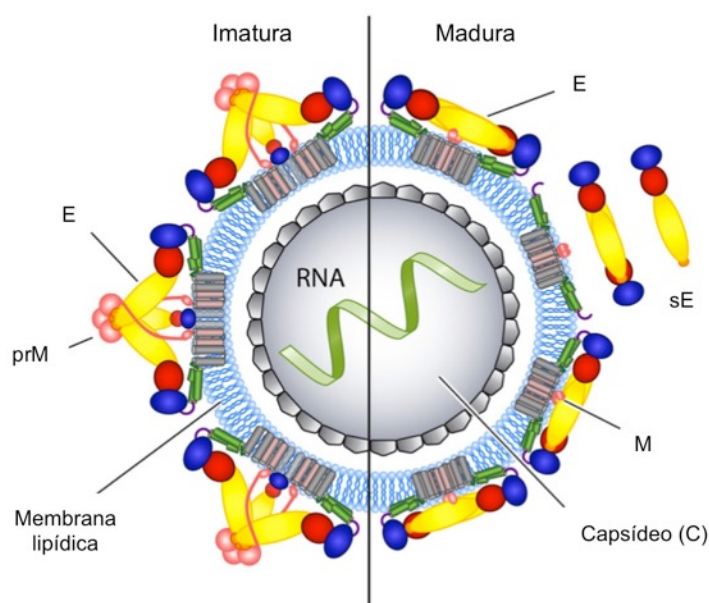


Figura 5. Representação da estrutura da partícula imatura (esquerda) e madura (direita) do vírus Zika. A estrutura em dímero da proteína E (sE) aparece em destaque. Fonte: Adaptado de (HEINZ; STIASNY, 2017).

Até agora, não há estudos que relacionem especificamente o estado de maturação das partículas virais em relação à sua capacidade de entrada mediada por receptores de fosfatidilserina. É provável que diferentes vírus, ou mesmo diferentes cepas do mesmo vírus, demonstrem diferentes graus de exposição à membrana e, portanto, possam diferir no uso de receptores lipídicos de entrada (LOZACH et al., 2007; REY; STIASNY; HEINZ, 2017). A heterogeneidade das partículas virais parece ser necessária para o uso de mimetismo apoptótico no processo de entrada de *Flavivirus* em células, porque a membrana viral, contendo PS, não seria acessível em vírus maduros (SMIT et al., 2011).

A liberação de partículas parcialmente maduras, mas infecciosas, sugere que a prM ou o complexo prM-E, expostos na superfície dessas partículas, poderiam mediar o processo de entrada viral, em certos casos. Neste contexto, é provável que existam locais de N-glicosilação na prM (REY; STIASNY; HEINZ, 2017; YUAN et al., 2017).

Duas revisões bibliográficas decorrentes deste trabalho foram publicadas (APÊNDICE A e APÊNDICE B).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Embora ensaios *in vitro* recentes tenham descrito a relação entre algumas moléculas de adesão do ZIKV e receptores de entrada no hospedeiro separadamente, uma abordagem que unifique o estudo dessas interações ainda não foi feita. Uma maneira de tornar isso possível é verificar a ligação destas moléculas usando métodos computacionais, como simulações de docking e dinâmica molecular. O uso destas metodologias, ajudam a esclarecer esses mecanismos virais e celulares, reduzindo tempo, orientando os pesquisadores na elaboração de hipóteses mais direcionadas. Este estudo é, portanto, dividido em dois tipos de análise: *in silico* e *in vitro*.

3.1 DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Os ensaios *in silico* seguiram o esquema da **figura 6** a seguir:

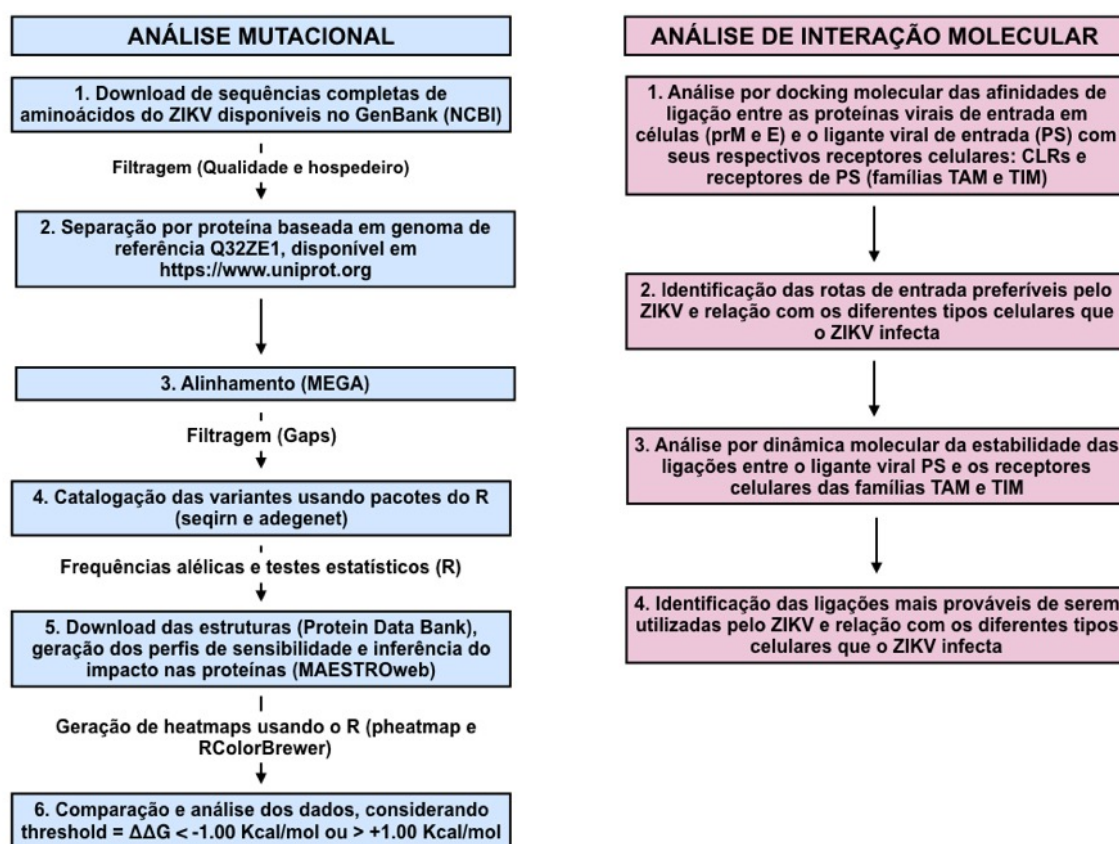


Figura 6. Etapas das análises *in silico* mutacionais e de interação molecular.

No contexto dos ensaios *in vitro*, trata-se de um estudo experimental laboratorial, de abordagem qualitativa e quantitativa, que se deu pelo cultivo e consequente infecção de células neuronais gliais da linhagem U87-MG pela cepa contemporânea pernambucana do vírus Zika PE243 (GenBank ID: KX197192.1). Foi quantificada a carga viral após 1 hora de infecção, em MOI (*Multiplicity of infection*) = 1 e 4,5, através de RT-qPCR (reação da transcriptase reversa, seguida de PCR quantitativa). Diferentes concentrações (25 e 75µM) do inibidor de furina (Furin Inhibitor I – Calbiochem Merk Millipore®) foram empregadas, com o objetivo de subdividir o nível de maturidade das partículas virais.

3.2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

O Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) é formado por laboratórios de pesquisa e inovação que proveram a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto, apresentando equipamentos laboratoriais modernos que viabilizaram a execução da proposta. O LIKA também dispõe de um laboratório de cultura celular completo, o que permitiu a realização dos experimentos *in vitro* do projeto.

As análises *in silico* foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular, do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram realizadas as simulações de docking e dinâmica molecular, bem como as análises estatísticas do projeto.

3.3 DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR

As simulações de docking foram realizadas utilizando servidores SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) e ClusPro (COMEAU et al., 2004). O servidor SwissDock foi usado para determinar a energia livre de Gibbs (ΔG) dos complexos proteína-ligante, enquanto o servidor ClusPro foi utilizado para medir a força de van der Waals e interações eletrostáticas (VdW + Elec) dos complexos proteína-proteína.

Os resultados das análises de docking foram submetidos à simulações de dinâmica molecular utilizando o pacote GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) (ABRAHAM et al., 2015). Foi utilizado campo de força

GROMOS 96 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004). O sistema foi sovatado em água e ionicamente equilibrado, e a energia do sistema, minimizada. Temperatura e pressão foram ajustadas em 1BAR e 36°C. Foram observados padrões de desvio médio quadrático (RMSD) em função do tempo de simulação de cada sistema, bem como a área superficial acessível ao solvente (SASA). Também foram analisados critérios de flutuação quadrática média da raiz (RMSF) e de raio de giro dos aminoácidos da cadeia polipeptídica. O tempo de simulação estabelecido foi de 200ns.

A trajetória do RMSD é usada para prever a estabilidade da proteína. Maior valor de RMSD implica baixa estabilidade da estrutura da proteína. A análise SASA avalia a área de superfície da proteína que é acessível ao solvente. Em geral, a medição do SASA é usada para avaliar a estabilidade da proteína. SASA inferior indica maior estabilidade termodinâmica da proteína e maiores valores de SASA sugerem expansão relativa. A análise RMSF pode ser usada como uma ferramenta para descrever as diferenças locais de flexibilidade entre os resíduos ao longo da simulação MD. Valores mais altos de RMSF mostram movimentos mais flexíveis, enquanto valores baixos de RMSF mostram movimentos limitados durante a simulação em relação à sua posição média. A análise do raio de giro indica o nível de compactação de cada molécula e as dimensões gerais da estrutura (KREBS; MESQUITA, 2016; KUMAR et al., 2014; LEE et al., 2014).

3.3.1 Preparação de ligantes e receptores

As estruturas 3D das moléculas DC-SIGN, L-SIGN, MMR, CLEC5A, TIM1, TIM 3, TIM4, GAS6 e PROS foram baixadas do Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000) (Códigos ID, respectivamente: 2IT5, 1XAR, 1EGG, 2YHF, 5F70, 5F71, 5D2N, 2C5D e 1Z6C) para servirem como receptores. Dois íons de cálcio foram adicionados às moléculas DC-SIGN, L-SIGN e MMR (cálcio-dependentes), usando o MIB server (LIN et al., 2016). As moléculas de água e outras subunidades não relacionadas no complexo foram removidas. A molécula de fosfatidilserina foi baixada do servidor ZINC (IRWIN et al., 2012) (Código Id: 12484909) e a molécula N-acetilglicosamina (NAG, N-glicano utilizado na glicosilação) foi baixada do Protein Data Bank (Código Id: 5IZ7), e ambos foram tomados como ligantes. A proteína E glicosilada com NAG utilizada como ligante na análise de docking dos complexos proteína-proteína foi baixada no

mesmo banco de dados (Código Id: 5IZ7). As moléculas foram refinadas através do Zhang Lab server e validadas pelo RAMPAGE – Ramachandram Plot Assessment.

3.3.2 Modelagem molecular da proteína prM

A proteína prM foi modelada usando o servidor I-TASSER (YANG et al., 2014), glicosilada com uma molécula de NAG, usando o GLYCAM Web-Server e, depois, usada como ligante.

3.4 CULTIVO, INFECÇÃO E PROCESSAMENTO DE CÉLULAS

3.4.1 Expansão celular da linhagem U87-MG

Células U87-MG (linhagem celular de glioblastoma humano) foram generosamente fornecidas pelo Prof. Del Sal G. (Universidade de Trieste, Itália) e cultivadas em meio mínimo essencial Eagle (MEM, Sigma-Aldrich®). O meio foi suplementado com L-glutamina (200 mM) (10%) (Sigma-Aldrich®) e solução de Penicilina-Streptomicina (10.000 unidades de penicilina e 10 mg de streptomicina/mL) (10%) (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, foi adicionado soro fetal bovino (SFB) (10%) (Gibco®) à esta solução.

As células foram expandidas em garrafas de 75cm² (pré-tratadas para aderência celular e com filtro) (Greiner®) até a obtenção do número de células suficiente para realização do experimento. Para contagem e estabelecimento da viabilidade, as células foram coradas com azul de tripan (0,4%) (Gibco®) na seguinte proporção: 10µL de solução de suspensão celular + 90 µL de azul de tripan e, então, contadas em câmara de Neubauer. O resultado foi multiplicado pelo fator de diluição de 10⁵.

3.4.2 Expansão da cepa viral pernambucana ZIKV PE243

Células VERO (linhagem celular renal de macaco verde africano) foram generosamente fornecidas pelo Prof. Del Sal G. (Universidade de Trieste, Itália) e cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM, Sigma-Aldrich®). O meio foi suplementado com L-glutamina (200 mM) (10%) (Sigma-Aldrich®) e solução de Penicilina-Streptomicina (10.000 unidades de penicilina e 10 mg de streptomicina/mL) (10%) (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, foi adicionado SFB (10%) (Gibco®) à esta

solução. As células foram expandidas em garrafas de 75cm² (pré-tratadas para aderência celular e com filtro) (Greiner®) para posterior infecção e expansão viral.

Uma alíquota da cepa pernambucana ZIKV PE243 foi gentilmente fornecida pelo Professor Lindomar José Pena, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco).

Para expansão viral, uma garrafa de 75cm² (numa confluência de 90%) de células VERO, previamente lavada com PBS (tampão salina-fosfato) (150 mM fosfato de sódio; 150 mM NaCl; pH 7,2±0,1) (Sigma-Aldrich®), foi infectada com 50µL da solução stock de vírus e incubada com 5mL de meio (2% de SFB) por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂, sendo homogeneizada a cada 15 minutos para melhor adsorção viral (AGBULOS et al., 2016). Em seguida, foram adicionados 10mL de meio (2% de SFB), totalizando 15mL na garrafa. As células, então, foram incubadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Após 72 horas, 5mL do sobrenadante foi retirado, repassado para uma nova garrafa de VERO (previamente lavada com PBS, numa confluência de 90%) e incubado por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂, sendo a garrafa homogeneizada a cada 15 minutos para melhor adsorção viral. Em seguida, foram adicionados 10mL de meio (2% de SFB), totalizando 15mL na garrafa. As células, então, foram incubadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Após 72 horas, os 15mL do sobrenadante foram repassados para 3 novas garrafas de VERO (previamente lavadas com PBS, numa confluência de 90%) (5mL por garrafa) por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂, sendo as garrafas homogeneizadas a cada 15 minutos para melhor adsorção viral. Em seguida, foram adicionados 10mL de meio (2% de SFB) em cada garrafa, totalizando 15mL por garrafa. As células, então, foram incubadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após 72 horas, os 45mL do sobrenadante das 3 garrafas foram aliquotados e guardados a -80°C. Uma alíquota foi utilizada para titulação viral (COELHO et al., 2017).

3.4.3 Titulação viral por Tissue Culture Infective Dose 50% (TCID₅₀)

Células VERO foram diluídas em meio DMEM (10% de SFB) até atingirem uma concentração final de 10⁶ células/mL. Em seguida, foram cultivadas em uma placa de

96 poços (de fundo chato) (Greiner®), tendo sido distribuído um total de 100µL (numa concentração de 10^6 células/mL) de suspensão celular por poço. Posteriormente, a placa de titulação foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas para atingir uma confluência de 90% (AGBULOS et al., 2016).

Após 48 horas, a placa foi vertida para retirada do meio. Em um microtubo, 150µL de alíquota viral foram diluídos em 350µL de meio DMEM (2% SFB) e diluições em série (de 10^{-1} a 10^{-12}) foram realizadas (7 repetições + 1 controle). Em seguida, 50µL de cada diluição foram distribuídos por poço/coluna. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂, sendo homogeneizada a cada 15 minutos para melhor adsorção viral. Em seguida, foram adicionados 100µL de meio (2% de SFB) em cada poço, totalizando 150µL por poço. As células, então, foram incubadas por 120 horas a 37°C e 5% de CO₂, observadas para efeito citopático e tituladas, segundo REED & MUENCH, 1938.

3.4.4 Ensaio in vitro da maturação da partícula viral e infectividade

Células da linhagem glial U87-MG foram cultivadas em 2 placas de 6 poços (pré-tratadas para aderência celular) (Sigma-Aldrich®) e em meio MEM (10% SFB) (2mL por poço), num total de 2×10^5 células por poço. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS. Duas placas foram incubadas com 2mL de solução de meio MEM (2% SFB) + inibidor de furina (Furin Inhibitor I – Calbiochem Merk Millipore®), em diferentes concentrações (25 e 75µM), por 30 minutos (sendo homogeneizadas a cada 10 minutos). Os controles foram incubados em 2mL de meio MEM (2% SFB), sob as mesmas condições. Em seguida, o meio (com e sem inibidor) foi retirado das placas e as 2 placas foram infectadas em MOI=1 e MOI=4,5, assegurando um índice de infectividade celular de 63,2% e 99%, respectivamente.

As soluções de MOI foram preparadas a partir de sobrenadante contendo vírus numa titulação de TCID₅₀ = $1,48 \times 10^7$. As soluções contendo vírus em diferentes concentrações foram distribuídas nas placas, totalizando 300µL de solução por poço. Em seguida, as duas placas foram levadas à incubadora por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos para melhor adsorção viral (AGBULOS et al., 2016). Em seguida, um total de 1,7mL de meio (2% SFB) foi adicionado por poço. Os sobrenadantes e as células foram coletados 1 hora após a infecção.

Os RNAs virais foram extraídos dos sobrenadantes, oriundos de cada cultivo, usando o kit QIAamp Viral RNA Mini Spin (Qiagen®), segundo instruções do fabricante. Os RNAs virais presentes no interior das células foram extraídos utilizando o kit TRIzol Reagent (Invitrogen®), segundo instruções do fabricante. O RNA do ZIKV foi detectado por RT-qPCR em uma única etapa como descrito por LANCIOTTI et al., 2008. A amplificação foi realizada na plataforma do ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems®) utilizando o kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®).

O ensaio *in vitro* foi realizado em duplicata e seguiu o esquema da **Figura 7** abaixo:

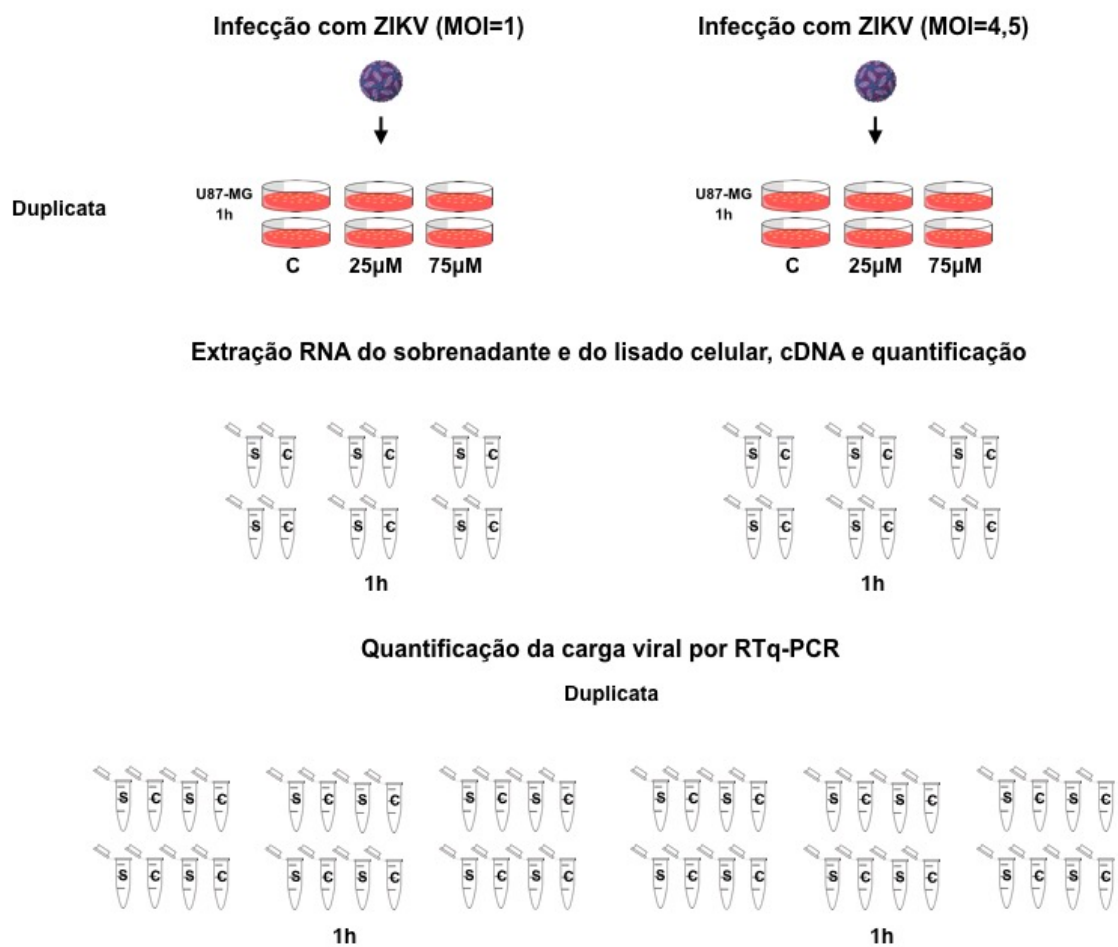


Figura 7. Etapas dos ensaios *in vitro* de cultivo celular, infecção viral, incubação na presença de inibidor de furina e quantificação de carga viral.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação quantitativa relativa ao crescimento viral nos tratamentos descritos na figura 7, foi realizado pelo “*fold change*” entre o grupo controle (referência) e tratado com o inibidor da furina pela fórmula:

$$fold\ change = 2^{-(CT\ controle - CT\ Tratado)},$$

onde o CT é o ciclo threshold médio obtido da amplificação da RT-qPCR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MUTACIONAL LANDSCAPE OF ZIKA VIRUS STRAINS WORLDWIDE AND ITS STRUCTURAL IMPACT ON PROTEINS

Artigo 1

Almerinda Agrelli¹, Ronald Rodrigues de Moura², Sergio Crovella^{1,2}, Lucas André Cavalcanti Brandão^{1,3}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) - Federal University of Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Brazil.

²Department of Genetics - Federal University of Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Brazil.

³Department of Pathology - Federal University of Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Brazil.

* Corresponding author:

Almerinda Agrelli

PhD student in Biology Applied to Health at Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) - Federal University of Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Brazil. CEP: 50670-901. Phone number: +55 (81) 2126-8587 / +55 (81) 99466-6658. E-mail:

almerinda.agrelli@ufpe.br/almerindaapimentel@gmail.com

E-mails from co-authors:

ronald.moura@ufpe.br / ronaldmoura1989@gmail.com

sergio.crovella@ufpe.br / crovelser@gmail.com

lucas.cbrandao@ufpe.br / lucabrand@gmail.com

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) has spread globally and has been linked to the onset of microcephaly and other brain abnormalities. The ZIKV genome consists of an ~10.7 kb positive-stranded RNA molecule that encodes three structural (C, prM and E) and seven nonstructural (5'-NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A/2K-NS4B-NS5-3') proteins. In this work, we looked for genetic variants in 485 ZIKV complete genomes from GenBank (NCBI) and performed a computational systematic approach using MAESTROweb server to assess the impact of nonsynonymous mutations in ZIKV proteins (C, M, E, NS1, NS2A, NS2B-NS3 protease, NS3 helicase and NS5). Then, we merged the data and correlated it with the phenotypic reports of ZIKV circulating strains. The sensitivity profile of the proteins showed 96 mutational hotspots. We found 22 relevant mutations in proteins C (I80T), NS2A (I34M/T/V, I45V, I80T/V, L113F, A117V, I118V, L128P, V143A, T151A, M199I/V, R207K and L208I) and NS3 helicase (D436G, Y498H, R525K, Q528R and R583K) of the circulating strains. Our analysis exploited the impact of nonsynonymous mutations on ZIKV proteins, their structural and functional insights. The results presented here could advance our current understanding on ZIKV proteins functions and pathogenesis.

Key-words: Zika virus; Mutation; Nonsynonymous; Protein C; NS2A; NS3 helicase

1. INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an enveloped single-stranded RNA (ssRNA) arbovirus of the *Flavivirus* genus transmitted by *Aedes* mosquitoes (Musso, 2015), which was first isolated in Uganda in 1947 from a sentinel monkey (Dick et al., 1952). Nevertheless, little attention was paid to this virus until outbreaks were reported in Yap Island, Federated States of Micronesia, in 2007 (Duffy et al., 2009), and French Polynesia in 2013 (Cao-Lormeau et al., 2014), where it was associated with the development of Guillain-Barré Syndrome. In 2015, during the outbreak in Brazil, ZIKV was first linked to neonatal microcephaly (Schuler-faccini et al., 2016) and since then the virus has spread rapidly throughout many countries around the world (Kindhauser et al., 2016).

Phylogenetic analyses diverge about how many ZIKV lineages exist. An analysis of viral protein NS5 nucleotide sequences suggested the existence of three major lineages: West and East African and Asian lineages (Shen et al., 2016), however no genome of the West African lineage was completely sequenced or made available to date (Gong et al., 2017). Using different approaches, more authors (Faria et al., 2016; Haddow et al., 2012; Wang et al., 2016) have classified ZIKV into two major lineages: African and Asian. Asian lineage has been implicated as responsible for the recent epidemics in Americas (Enfissi et al., 2016; Ramaiah et al., 2017) and has been so far the only lineage associated with fetal microcephaly and other neurological abnormalities (McGrath et al., 2017).

ZIKV genome has ~10.7 kb, encoding 3,423 amino acids, with two flanking 5' and 3' noncoding regions and a single long structure encoding a polyprotein (5'UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A/2K-NS4B-NS5-3'UTR), which is cleaved during viral replication into three structural proteins [capsid (C), pre-membrane (prM) or membrane (M), and envelope (E)] involved in viral entry and particle assembly, and seven nonstructural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) responsible for viral replication, assembly and evasion from innate immune system (Göertz et al., 2017; Hou et al., 2017).

Many ZIKV sequences have been made available openly for the scientific community, including complete genomes from strains isolated around the world. Some variants are known to affect viral infectivity as NS1's variant A188V (Delatorre et al., 2017; Xia et al., 2018), or involved with the host prognosis as the S17N mutation (Nambala and Su, 2018; Yuan et al., 2017) in prM protein of immature ZIKV particles. Many studies have been carried out with ZIKV genomes allowing the phylogeography

of the virus to be traced, but lack information regarding the impact of these mutations on viral proteins and their phenotypic importance.

Here, we analyzed ZIKV complete amino acid sequences from GenBank searching for nonsynonymous mutations and performed a systematic approach to assess the impact of these mutations on proteins C, M, E, NS1, NS2A, NS2B-NS3 protease, NS3 helicase and NS5 of ZIKV, using MAESTROweb server. MAESTRO is a multi-agent prediction system that predicts changes in stability upon point mutations in proteins based on statistical scoring functions and different machine learning approaches (Laimer et al., 2015).

Afterwards, we crossed these results aiming to identify critical mutations in the circulating ZIKV strains.

2. MATERIAL AND METHODS

We downloaded 1,141 polyprotein sequences of ZIKV from NCBI GenBank (Clark et al., 2016) from different countries and continents. After pruning for host (Human), incompleteness and low-quality, we kept 485 amino acid sequences.

Subsequently, we split the full polyproteins' amino acid sequences into their respective proteins based on the positions described in the ZIKV full reference genome accession Q32ZE1, found in <https://www.uniprot.org>. Then, we used MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al., 2018) to align (MUSCLE algorithm with default parameters) and manually inspect the sequences adding or removing gaps as necessary. From the aligned sequences, we proceeded with three analysis described below.

Firstly, we catalogued all the variants by using 'seqinr' (version 3.4.5) (Charif et al., 2015) and 'adegenet' (version 2.1.1) (Jombart, 2008) packages of R (version 3.5.1), estimating their allele frequencies and other statistical tests.

Afterwards, we used MAESTROweb (Laimer et al., 2015) server to calculate the sensitivity profile of proteins C, M, E, NS1, NS2A, NS2B-NS3 protease, NS3 helicase and NS5 of ZIKV, searching for mutational hotspots and inferring their impact on the protein function. To achieve this, we downloaded structures from Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000) of each protein of ZIKV, with the exception of the precursor portion "pr" of protein prM, NS4A and NS4B, which were not available in the database. The structures were selected based on their resolutions and the most complete protein linear structure. The following protein structures were used: C (PDB

ID: 5YGH), M (PDB ID: 5IZ7), E (PDB ID: 5IZ7), NS1 (PDB ID: 5K6K), NS2A (PDB ID: 5GJ4), NS2B-NS3 (PDB ID: 5GJ4), NS3 (PDB ID: 5JMT) and NS5 (PDB ID: 5TFR). More details on the collection and selection of sequences are available in **Table 1**.

Lastly, the sensitivity profiles of the proteins were analyzed through heatmaps generated using R packages 'pheatmap' (version 1.0.10) (Kolde, 2018) and 'RColorBrewer' (version 1.1.2) (Neuwirth, 2014). We considered relevant stability changes on the protein when the difference of free energy ($\Delta\Delta G$) was lower than -1.00 Kcal/mol or higher than +1.00 Kcal/mol as described in Capriotti et al., 2005 [26]. Once we knew the variants from the amino acid sequences and the mutational hotspots in the heatmaps from the sensitivity profiles, we were able to compare the data and see which critical nonsynonymous mutations in fact existed in the circulating ZIKV strains.

3. RESULTS

Concerning the circulating strains origin, we found two sequences from Nigeria, in the African continent, out of the 485 analyzed. Strains isolated from the Asian continent are distributed as follows: Singapore (105), China (27), Thailand (14), Japan (4), Cambodia (3), South Korea (3), Taiwan (2) Indonesia (1), Philippines (1) and Russia (5). In Europe, we found 6 sequences from Italy. In the North America continent: Dominican Republic (23), USA (35), Honduras (22), Nicaragua (18), Haiti (7), Mexico (30), Panama (4), Puerto Rico (7), Jamaica (4), Cuba (3), Guatemala (3) and Martinique (2). In South America, where the outbreaks presented more severe clinical consequences, strains were isolated in Colombia (50), Brazil (74), Ecuador (3), Suriname (3), Venezuela (3), Peru (2) and French Guiana (1). In Oceania: French Polynesia (13), Micronesia (1) and Australia (1). Three sequences did not have information on its origin (in **Supplementary Table 1**).

Regarding the samples' source, we found 122 samples extracted from blood, 54 from urine, 9 from saliva, 7 from brain, 7 from kidney, 4 from sperm, 2 from mammalian milk, 2 from placenta, 1 from amniotic fluid and 1 from cerebrospinal fluid. Other 276 sequences did not specified the source of the samples (in **Supplementary Table 2**).

We found 403 mutant *loci* throughout the 485 amino acid sequences analyzed distributed as follows: 4 in protein C, 35 in protein prM, 60 in protein E, 48 in protein NS1, 50 in protein NS2A, 18 in NS2B protein, 65 in protein NS3, 16 in protein NS4A, 28 in protein NS2B, 1 in portion 2K and 78 in protein NS5.

In the structural analysis, considering $\Delta\Delta G$ values lower than -1.00 or higher than +1.00, we found 96 important mutational hotspots in the heatmaps from the sensitivity profiles of proteins C, M, NS2A, NS2B-NS3 protease and NS3 helicase. Proteins E, NS1 and NS5 did not show any significant hotspots (in **Supplementary Figure 1**). Therefore, subsequent analyzes were performed in 18 *loci* comprising 22 variants that matched the position in the hotspots (according to the great impact on the protein stability) and in the mutant circulating strains. We highlighted these mutations in **Table 2**.

Besides actively participating in the process of viral particles assembly, the structural protein C contains four α -helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 4$) and interacts with host proteins, modulating cellular metabolism, apoptosis and immune response (Shang et al., 2018). Protein C presented a single variation in a mutational hotspot located at position 80, changing from an interleukin residue to a threonine (I80T; $\Delta\Delta G = +2.8329$).

NS2A is a hydrophobic protein essential for RNA synthesis and pathogenesis (Yoon et al., 2017). A topology analysis of DENV NS2A showed that NS2A has eight predicted transmembrane segments (pTMS1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8) (Xie et al., 2013). The C-terminal half (pTMS4-8) is thought to participate in the processes of RNA replication, particle assembly and secretion (Wu et al., 2015). Twelve *loci* showed amino acid substitutions that exceeded the $\Delta\Delta G$ thresholds in protein NS2A. We highlight three sites that showed multiple mutations with significant impact on the protein: I34M/T/V ($\Delta\Delta G = +1.9966$, $+2.6724$ and $+2.2171$, respectively); I80T/V ($\Delta\Delta G = +1.1619$ and $+2.1727$, respectively); and M199I/V ($\Delta\Delta G = +2.4280$ and $+2.3014$, respectively).

In *Flavivirus*, cytoplasmic cleavages including those at junctions between NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A and NS4B/NS5 are mediated by the viral two-component serine protease NS2B-NS3, which is formed by the N-terminal part of NS3 and the cofactor region of NS2B (Li et al., 2018). The C-terminal region of the protein NS3 is a RNA helicase with three domains: domain I (residues 182–327), domain II (residues 328–480) and domain III (residues 481–617) (Tian et al., 2016). Given the essential role of the helicase activity in genome replication, NS3 helicase has been an attractive target for antiviral drug development (Luo et al., 2015; Ramharack and Soliman, 2016; Yuan et al., 2016). There are two important active-binding regions in domains I and III, respectively: the ATP-binding site and the RNA-binding groove. They form profound hydrophobic cavities in the electrostatic surface area, allowing

ATP and ssRNA to bind. Inhibition of either one of these sites leads to viral insufficient maturation and replication (Ramharack et al., 2017). Five substitutions were predicted to cause significant changes in NS3 helicase: D436G ($\Delta\Delta G = +1.2411$) on domain II; and Y498H ($\Delta\Delta G = +1.1694$), R525K ($\Delta\Delta G = +1.9792$), Q528R ($\Delta\Delta G = +1.5107$) and R583K ($\Delta\Delta G = +1.5084$) on domain III, which may lead to improper RNA-binding and suppress viral replication.

We did not find any significant mutation in protein M or NS2B-NS3 protease.

4. DISCUSSION

Despite the recent global spread and the appearance of severe symptoms associated with the infection, vaccines or drugs against ZIKV have not been approved to date; moreover there is still no explanation regarding why, considering the same lineage (Asian) origin, in a short period of time, the clinical consequences of the infection were different between the outbreaks of Yap Island (2007), Brazil (2015) and Colombia (2015), these last two being neighboring countries with similar socioeconomic and climatic conditions. To uncover these questions, studies that relate the impact of genetic variations and their phenotypic consequences in ZIKV pathogenesis are necessary.

It is believed that Brazil and Colombia ZIKV strains were originated from French Polynesia (Asian lineage) (Musso, 2015; Wang et al., 2016), although the pattern of clinical outcomes resulting from ZIKV infection reported in these two outbreaks were notably different: considerably more cases of microcephaly and/or central nervous system malformations in neonates were reported in Brazil while Guillain-Barré Syndrome were proportionally more reported in Colombia (Méndez et al., 2017; World Health Organization, 2017, 2016). The Yap Island outbreak is also found to be caused by the Asian lineage (Pettersson et al., 2018), however no neurological symptoms were reported there (Duffy et al., 2009; Mier-Y-Teran-Romero et al., 2018).

We found four polymorphic *loci* between the populations from French Polynesia, Brazil and Colombia: position 80 in protein C and positions 113, 143 and 199 in NS2A. Comparing the distribution of the allele frequencies of the relevant mutations among sequences isolated from these countries, we observed that the presence of the T allele at the position 80 in protein C is significantly more frequent in Colombia than in Brazil or French Polynesia ($p\text{-value}=0.0177$). Curiously, this allele is only present in American

strains and thus may have a role in ZIKV adaptation process. The comparisons for other *loci* did not reached a significant level.

Two analyzed African strains (both isolated from Nigeria) showed a six amino acid deletion from position 155 to 160 (GenBank IDs: AEN75265 and AMR68906) in protein E. These results reinforce those found by Fontes-Garfias et al., 2017, which detected a similar deletion in other African strains. All the analyzed contemporary strains (Asian lineage) lacked this deletion. Thus, this deletion might represent a criterion of differentiation between ZIKV lineages. Curiously, substitutions V45I, T143A and L208I (in NS2A) and R583K (in NS3 helicase) were also found only in these two analyzed Nigerian sequences. A recent comparative *in vitro* study conducted with Asian and African lineages revealed that Nigerian strain (GenBank ID: KU963574.2) caused severe placental cell lysis, whereas viral replication rates remained similar between both lineages (Sheridan et al., 2018). The authors suggested that infection with African lineage in early pregnancy may result in pregnancy loss rather than malformations of the nervous system. It is important to note that these findings may generate a new argument about underreported cases of abortion in African countries where ZIKV circulates.

We searched the literature for phenotypical (clinical and *in vitro*) data of the circulating strains carrying the mutations with predicted great impact on the proteins stability. We found mutations L113F and I118V at the C-terminal half of NS2A in sequences (GenBank IDs: AMD16557 and AVV62004, respectively) extracted from samples of women whose fetuses developed microcephaly (Calvet et al., 2016; Wongsurawat et al., 2018); in addition, mutations R207K and L208I (GenBank IDs: AMK49492 and APH11522, respectively) were related to common symptoms of ZIKV infection, such as fever, rash and headache (Ho et al., 2017; Perkasa et al., 2016). The results above-mentioned suggest that these mutations are compatible with viral replication and infectivity despite their predicted impact on the protein stability. We were not able to find any documented phenotypical report on the other variants.

Among the analyzed sequences, we found that valine was more frequent (473 sequences) than alanine (seven sequences) at position 188 of the NS1 protein. Another important *locus* is the position 17 in prM (position 139 considering ZIKV polyprotein), where we found 345 sequences with asparagine, 132 with serine and also one with lysine (GenBank ID: APQ41785). It is possible that the high frequencies of the variants in our data are due to the fact that the genomes were isolated after

these mutations had been spread with the recent South America outbreaks. Although these variants are well known, they did not fall into any potential mutational hotspots.

5. CONCLUSIONS

One of the contributions of our work is the identification of mutations with relevant impact on stability of proteins C, M, NS2A, NS2B-NS3 protease and NS3 helicase of ZIKV. We also identified that some of these mutations are present in ZIKV circulating strains despite their predicted impact on the protein stability, meaning that these variants are compatible with viral replication and infectivity, as discussed previously. For a better understanding of the genotypic and phenotypic correlations involved in these complex processes, we emphasize the importance to make available clinical data together with the genomic sequence. Further *in vitro* and *in vivo* analysis of the impact of these mutations on ZIKV immunopathogenesis are needed to help clarify the questions outlined in this article.

DECLARATIONS OF INTEREST

None declared.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the National Council for the Improvement of Higher Education – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Department of Science and Technology of the Ministry of Health (Decit/SCTIE/MS).

REFERENCES

- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Brown, W.C., Akey, D.L., Konwerski, J.R., Tarrasch, J.T., Skiniotis, G., Kuhn, R.J., Smith, J.L., 2016. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 23, 865.
- Calvet, G., Aguiar, R.S., Melo, A.S.O., Sampaio, S.A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E.S.M., de Sequeira, P.C., de Mendonça, M.C.L., de Oliveira, L., Tschoeke, D.A., Schrago, C.G., Thompson, F.L., Brasil, P., dos Santos, F.B., Nogueira, R.M.R., Tanuri, A., de Filippis, A.M.B., 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P.,

- Sall, A.A., Musso, D., 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1960. <https://doi.org/10.3201/eid2011.141380>
- Capriotti, E., Fariselli, P., Calabrese, R., Casadio, R., 2005. Protein Structure and Function Predicting protein stability changes from sequences using support vector machines. *Bioinformatics* 21, 54–58. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1109>
- Charif, D., Lobry, J.R., Necsulea, A., Palmeira, L., Perriere, G., Penel, M.S., 2015. Package seqinr. R Packag. <https://doi.org/10.1093/nar/12.1Part1.121>>.License
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2016. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 44, D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Consortium, T.U., 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, 158–169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- Delatorre, E., Mir, D., Bello, G., 2017. Tracing the origin of the NS1 A188V substitution responsible for recent enhancement of ZIKA virus asian genotype infectivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 793–795. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170299>
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., Haddow, A.J., 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., Rousset, D., 2016. Zika virus genome from the Americas. *Lancet* 387, 227–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00003-9)
- Faria, N.R., Azevedo, R. do S. da S., Kraemer, M.U.G., Souza, R., Cunha, M.S., Hill, S.C., Thézé, J., Bonsall, M.B., Bowden, T.A., Rissanen, I., Rocco, I.M., Nogueira, J.S., Maeda, A.Y., Vasami, F.G. da S., Macedo, F.L. de L., Suzuki, A., Rodrigues, S.G., Cruz, A.C.R., Nunes, B.T., Medeiros, D.B. de A., Rodrigues, D.S.G., Nunes Queiroz, A.L., Silva, E.V.P. da, Henriques, D.F., Travassos da Rosa, E.S., de Oliveira, C.S., Martins, L.C., Vasconcelos, H.B., Casseb, L.M.N., Smith, D. de B., Messina, J.P., Abade, L., Lourenço, J., Alcantara, L.C.J., Lima, M.M. de, Giovanetti, M., Hay, S.I., de Oliveira, R.S., Lemos, P. da S., Oliveira, L.F. de, de Lima, C.P.S., da Silva, S.P., Vasconcelos, J.M. de, Franco, L., Cardoso, J.F., Vianez-Júnior, J.L. da S.G., Mir, D., Bello, G., Delatorre, E., Khan, K., Creatore, M., Coelho, G.E., de Oliveira, W.K., Tesh, R., Pybus, O.G., Nunes, M.R.T., Vasconcelos, P.F.C., 2016. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* (80-.). 352, 345 LP-349.
- Fontes-Garfias, C.R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A.E., Medeiros, D.B.A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C.M., Wakamiya, M., Rossi, S.L., Wang, T., Weaver, S.C., Shi, P.Y., 2017. Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Rep.* 21, 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016>
- Göertz, G.P., Abbo, S.R., Fros, J.J., Pijlman, G.P., 2017. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Res.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>
- Gong, Z., Xu, X., Han, G.Z., 2017. The diversification of Zika virus: Are there two distinct lineages? *Genome Biol. Evol.* 9, 2940–2945. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx223>
- Haddow, A.D., Schuh, A.J., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R.B., Weaver, S.C., 2012. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>

Ho, Z.J.M., Hapuarachchi, H.C., Barkham, T., Chow, A., Ng, L.C., Lee, J.M.V., Leo, Y.S., Prem, K., Lim, Y.H.G., de Sessions, P.F., Rabaa, M.A., Chong, C.S., Tan, C.H., Rajarethinam, J., Tan, J., Anderson, D.E., Ong, X., Cook, A.R., Chong, C.Y., Hsu, L.Y., Yap, G., Lai, Y.L., Chawla, T., Pan, L., Sim, S., Chen, I.-C.M., Thoon, K.C., Yung, C.F., Li, J.H., Ng, H.L.D., Nandar, K., Ooi, P.L., Lin, R.T.P., Aw, P., Uehara, A., Pratim De, P., Soon, W., Hibberd, M.L., Ng, H.H., Maurer-Stroh, S., Sessions, O.M., 2017. Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. *Lancet Infect. Dis.* 17, 813–821.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30249-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30249-9)

Hou, W., Cruz-cosme, R., Armstrong, N., Obwolo, L.A., Wen, F., Hu, W., Luo, M.-H., Tang, Q., 2017. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene* 628, 117–128.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.049>

Jombart, T., 2008. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>

Kindhauser, M.K., Allen, T., Frank, V., Santhana, S., Dye, C., 2016. Zika : the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull. World Health Organ.* 94, 675–686.

<https://doi.org/10.2471/BLT.16.171082>

Kolde, R., 2018. Package ‘ pheatmap ’.

Kostyuchenko, V.A., Lim, E.X., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T., Ooi, J.S.G., Shi, J., Lok, S., Nile, W., Nile, W., Polynesia, F., Fig, E.D., Zikv, T., Fig, E.D., 2016. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* 533, 425–428.

<https://doi.org/10.1038/nature17994>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Laimer, J., Hofer, H., Fritz, M., Wegenkittl, S., Lackner, P., 2015. MAESTRO - multi agent stability prediction upon point mutations. *BMC Bioinformatics* 16, 1–13.

<https://doi.org/10.1186/s12859-015-0548-6>

Li, Y., Zhang, Z., Phoo, W.W., Loh, Y.R., Li, R., Yang, H.Y., Jansson, A.E., Hill, J., Keller, T.H., Nacro, K., Luo, D., Kang, C.B., 2018. Structural Insights into the Inhibition of Zika Virus NS2B-NS3 Protease by a Small-Molecule Inhibitor. *Structure* 26, 555–564.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.02.005>

Luo, D., Vasudevan, S.G., Lescar, J., 2015. The flavivirus NS2B – NS3 protease – helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res.* 118, 148–158.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>

McGrath, E.L., Rossi, S.L., Gao, J., Widen, S.G., Grant, A.C., Dunn, T.J., Azar, S.R., Roundy, C.M., Xiong, Y., Prusak, D.J., Loucas, B.D., Wood, T.G., Yu, Y., Fernández-Salas, I., Weaver, S.C., Vasilakis, N., Wu, P., 2017. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. *Stem Cell Reports* 8, 715–727.

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.008>

Méndez, N., Oviedo-Pastrana, M., Mattar, S., Caicedo-Castro, I., Arrieta, G., 2017. Zika virus disease, microcephaly and Guillain-Barré syndrome in Colombia: Epidemiological situation during 21 months of the Zika virus outbreak, 2015-2017. *Arch. Public Heal.* 75, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13690-017-0233-5>

Mier-Y-Teran-Romero, L., Delorey, M.J., Sejvar, J.J., Johansson, M.A., 2018. Guillain-Barré syndrome risk among individuals infected with Zika virus: a multi-country assessment. *BMC Med.* 16, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1052-4>

Musso, D., 2015. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg.*

- Infect. Dis. 21, 1887–1889. <https://doi.org/10.3201/eid2110.151125>
- Nambala, P., Su, W., 2018. Role of Zika Virus prM Protein in Viral Pathogenicity and Use in Vaccine Development. *Front. Microbiol.* 9, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01797>
- Neuwirth, E., 2014. RColorBrewer: ColorBrewer palettes. R Packag. version 1.1-2. <https://doi.org/citeulike-article-id:5433478>
- Perkasa, A., Yudhaputri, F., Yohan, B., Saw, K., Myint, A., Ledermann, J.P., Rosenberg, R., Powers, A.M., Sasmono, R.T., 2016. Isolation of Zika Virus from Febrile Patient, Indonesia Fatal Sickle Cell Disease and Zika Virus Infection in Girl from Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 924–925.
- Pettersson, J.H.-O., Bohlin, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Brynildsrud, O.B., Alfsnes, K., Cao-Lormeau, V.-M., Gaunt, M.W., Falconar, A.K., de Lamballerie, X., Eldholm, V., Musso, D., Gould, E.A., 2018. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 79. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0082-5>
- Phoo, W.W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M.Y., Loh, Y.R., Tan, Y.B., Ng, E.Y., Lescar, J., Kang, C., Luo, D., 2016. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat. Commun.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13410>
- Ramaiah, A., Dai, L., Contreras, D., Sinha, S., Sun, R., Arumugaswami, V., 2017. Comparative analysis of protein evolution in the genome of pre-epidemic and epidemic Zika virus. *Infect. Genet. Evol.* 51, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.012>
- Ramharack, P., Oguntade, S., Soliman, M.E.S., 2017. Delving into Zika virus structural dynamics-a closer look at NS3 helicase loop flexibility and its role in drug discovery. *RSC Adv.* 7, 22133–22144. <https://doi.org/10.1039/c7ra01376k>
- Ramharack, P., Soliman, M.E.S., 2016. RSC Advances and discovery – a route map to fill the gap. *RSC Adv.* 6, 68719–68731. <https://doi.org/10.1039/C6RA12142J>
- Schuler-faccini, L., Ribeiro, E.M., Feitosa, I.M.L., Horovitz, D.D.G., Cavalcanti, D.P., 2016. Possível associação entre a infecção pelo vírus zika e a microcefalia — Brasil, 2015. *Cent. Dis. Control Prev. - Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 1–4.
- Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J., Gao, G.F., 2018. Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *J. Mol. Biol.* 430, 948–962. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.006>
- Shen, S., Shi, J., Wang, J., Tang, S., Wang, H., Hu, Z., Deng, F., 2016. Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virol. Sin.* 31, 118–130. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3774-9>
- Sheridan, M.A., Balaraman, V., Schust, D.J., Ezashi, T., Michael Roberts, R., Franz, A.W.E., 2018. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PLoS One* 13, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200086>
- Tian, H., Ji, X., Yang, X., Xie, W., Yang, K., Chen, C., Wu, C., Chi, H., Mu, Z., Wang, Z., Yang, H., 2016. The crystal structure of Zika virus helicase: basis for antiviral drug design. *Protein Cell* 7, 450–454. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0275-4>
- Upadhyay, A.K., Cyr, M., Longenecker, K., Tripathi, R., Sun, C., Kempf, D.J., 2017. Crystal structure of full-length Zika virus NS5 protein reveals a conformation similar to Japanese encephalitis virus NS5. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* 73, 116–122. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17001601>
- Wang, L., Valderramos, S.G., Wu, A., Ouyang, S., Li, C., Brasil, P., Bonaldo, M., Coates, T., Nielsen-Saines, K., Jiang, T., Aliyari, R., Cheng, G., 2016. From

- Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host Microbe* 19, 561–565. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.006>
- Wongsurawat, T., Athipanyasilp, N., Jenjaroenpun, P., Jun, S.-R., Kaewnapan, B., Wassenaar, T.M., Leelahakorn, N., Angkasekwinai, N., Kantakamalakul, W., Ussery, D.W., Sutthent, R., Nookaew, I., Horthongkham, N., 2018. Case of Microcephaly after Congenital Infection with Asian Lineage Zika Virus, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 2–5.
- World Health Organization, 2017. Situation Report: Zika Virus, Microcephaly, Guillain-Barré Syndrome.
- World Health Organization, 2016. Zika Situation Report : Zika and potential complications 12-02-2016.
- Wu, R.-H., Tsai, M.-H., Chao, D.-Y., Yueh, A., 2015. Scanning Mutagenesis Studies Reveal a Potential Intramolecular Interaction within the C-Terminal Half of Dengue Virus NS2A Involved in Viral RNA Replication and Virus Assembly and Secretion. *J. Virol.* 89, 4281 LP-4295. <https://doi.org/10.1128/JVI.03011-14>
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M.I., Vasconcelos, P.F.C., Weaver, S.C., Wang, T., Rajsbaum, R., Shi, P.-Y., 2018. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat. Commun.* 9, 414. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>
- Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., Shi, P.-Y., 2013. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *J. Virol.* 87, 4609–4622. <https://doi.org/10.1128/JVI.02424-12>
- Yoon, K.J., Song, G., Qian, X., Pan, J., Xu, D., Rho, H.S., Kim, N.S., Habela, C., Zheng, L., Jacob, F., Zhang, F., Lee, E.M., Huang, W.K., Ringeling, F.R., Vissers, C., Li, C., Yuan, L., Kang, K., Kim, S., Yeo, J., Cheng, Y., Liu, S., Wen, Z., Qin, C.F., Wu, Q., Christian, K.M., Tang, H., Jin, P., Xu, Z., Qian, J., Zhu, H., Song, H., Ming, G. li, 2017. Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Cell* 21, 349–358.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.014>
- Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., Ji, X., Xu, Y.-P., Li, G., Li, C., Wang, H.-J., Deng, Y.-Q., Wu, M., Cheng, M.-L., Ye, Q., Xie, D.-Y., Li, X.-F., Wang, X., Shi, W., Hu, B., Shi, P.-Y., Xu, Z., Qin, C.-F., 2017. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* (80-.). 88, 11726–11737. <https://doi.org/10.1128/JVI.01140-14>
- Yuan, L., Wu, R., Liu, H., Wen, X., Huang, X., Wen, Y., Ma, X., Yan, Q., Huang, Y., Zhao, Q., Cao, S., 2016. The NS3 and NS4A genes as the targets of RNA interference inhibit replication of Japanese encephalitis virus in vitro and in vivo. *Gene* 594, 183–189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.055>

Table 1. PDB structures used to analyze the impact of nonsynonymous mutations on ZIKV proteins using MAESTROweb server. We used a ZIKV sequence from Uniprot (Consortium, 2017) as a reference genome.

Viral protein	PDB entry	Resolution (Å)	Residues within		Equivalent residues on heatmaps	Reference
			polyprotein of ZIKV reference genome (Q32ZE1)	Residues present in analyzed PDBs		
<i>C</i>	5YGH	1.884	1-104	26-98	26-98	(Shang et al., 2018)
<i>M</i>	5IZ7	3.7	216-290	216-290	1-75	(Kostyuchenko et al., 2016)
<i>E</i>	5IZ7	3.7	291-790	291-794	1-504	(Kostyuchenko et al., 2016)
<i>NS1</i>	5K6K	1.89	791-1142	785-1142	1-350	(Brown et al., 2016)
<i>NS2A</i>	5GJ4	1.839	1143-1368	1143-1368	1-226	(Phoo et al., 2016)
<i>NS2B/NS3</i>	5GJ4	1.839	1369-1498/1499-1666	1417-1469/1517-1669	1-53/19-171	(Phoo et al., 2016)
<i>NS3 helicase</i>	5JMT	1.796	1667-2115	1673-2115	175-617	(Tian et al., 2016)
<i>NS5</i>	5TFR	3.05	2517-3419	2522-3403	6-887	(Upadhyay et al., 2017)

Table 2. Variants found in sequences of circulating ZIKV strains available in GenBank that were predicted to have a major impact on ZIKV proteins.

66

Protein	Mutational position within protein (heatmap)	Most frequent amino acid	Variation	Minor allele frequencies (MAF)	$\Delta\Delta G$	Location at the protein
C	80	I	T	0.0330	+2.8329	α -4
NS2A	34	I	M/T/V	0.0062/0.0041/0.0020	+1.9966/+2.6724/+2.2171	pTMS2
	45	I	V	0.0041	+2.3067	pTMS2
	80	I	T/V	0.0063/0.0105	+2.1727/+1.1619	pTMS3
	113	L	F	0.0020	+1.2304	pTMS4
	117	A	V	0.0020	+2.2284	pTMS4
	118	I	V	0.0041	+1.0873	pTMS4
	128	L	P	0.0062	+1.1699	pTMS5
	139	I	V	0.0166	+2.2149	pTMS5
	151	T	A	0.0041	+2.2385	pTMS6
	199	M	I/V	0.0021/0.0021	+2.4280/+2.3014	pTMS8
	207	R	K	0.0021	+2.1371	pTMS8
	208	L	I	0.0042	+1.2326	pTMS8
NS3 helicase	436	D	G	0.0020	+1.2411	Domain II
	498	Y	H	0.0020	+1.1694	Domain III
	525	R	K	0.0020	+1.9792	Domain III
	528	Q	R	0.0020	+1.5107	Domain III
	583	R	K	0.0042	+1.5084	Domain III

Color should be used for any figures in print.

SUPPLEMENTARY MATERIAL CAPTIONS

Supplementary Figure 1. Heatmaps from analyzed ZIKV proteins: C (A), M (B), E (C), NS1 (D), NS2A (E), NS2B-NS3 protease (F), NS3 helicase (G) and NS5 (H). We identified 96 hotspots in proteins C (10), M (11), NS2A (16), NS2B-NS3 protease (34) and NS3 helicase (25), which are highlighted below.

Supplementary Table 1. Distribution of the analyzed sequences by continent and country.

Supplementary Table 2. Source of the samples used to extract the viral RNA.

Supplementary Table 3. Analyzed sequences (485) and their respective GenBank IDs, samples' sources, countries of origin and alleles.

4.2 DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR

Estudos de docking molecular foram realizados para estimar a afinidade da ligação proteína-ligante entre: 1) os receptores TIM (TIM1, TIM3 e TIM4) e a PS; 2) as moléculas adaptadoras dos receptores TAM (GAS6 e PROS) e a PS; e entre CLRs e NAG. Os resultados estão expostos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Energia livre de ligação (kcal/mol) de complexos proteína-ligante entre famílias de receptores celulares (receptores de fosfatidilserina e receptores de lectina do tipo C) e seus respectivos ligantes virais (fosfatidilserina e NAG).

Família de receptor	Molécula	Ligante	ΔG (kcal/mol)
Receptores de fosfatidilserina	TIM1	Fosfatidilserina	-9,07
	TIM3		-8,53
	TIM4		-8,96
	GAS6		-9,72
	PROS		-8,31
Receptores de lectina do tipo C	DC-SIGN	NAG	-6,74
	L-SIGN		-7,89
	MMR		-7,23
	CLEC5A		-4,5

TIM1= Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T tipo 1

TIM3= Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T tipo 3

TIM4= Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T tipo 4

GAS6= Proteína específica de parada do crescimento 6

PROS= Proteína S

DC-SIGN= Proteína não-integrina de captura intercelular específica de célula dendrítica

L-SIGN= Ligante de molécula de adesão intercelular não-integrina específica de fígado/linfonodo

MMR= Receptor de manose

CLEC5A= Membro A da família do domínio da lectina tipo C 5

NAG= N-acetilglicosamina

Os resultados das análises de docking foram avaliados com base na energia livre de Gibbs (ΔG) e foi observada uma pequena diferença de valores de ΔG dentre os membros da família de receptores TIM, tendo sido TIM1 o receptor com ligação mais estável com a PS ($\Delta G = -9,07$). Estes resultados coincidiram com os resultados achados nas análises de dinâmica molecular (**Figura 8**), com valores de RMSD

inferiores para TIM1 (aproximadamente 0,2nm) quando comparados a TIM3 e TIM4 (aproximadamente 0,3nm). Dentre as moléculas intermediárias dos receptores TAM, a GAS6 apresentou menor valor de ΔG ($\Delta G = -9,72$) do que a PROS ($\Delta G = -8,31$), sugerindo que a ligação dessas proteínas com a PS poderia ser mais efetiva se mediada por GAS6. Estes resultados corroboram com os encontrados nas análises de dinâmica molecular (**Figura 9**), com valores de RMSD levemente inferiores para GAS6 (aproximadamente 0,5nm).

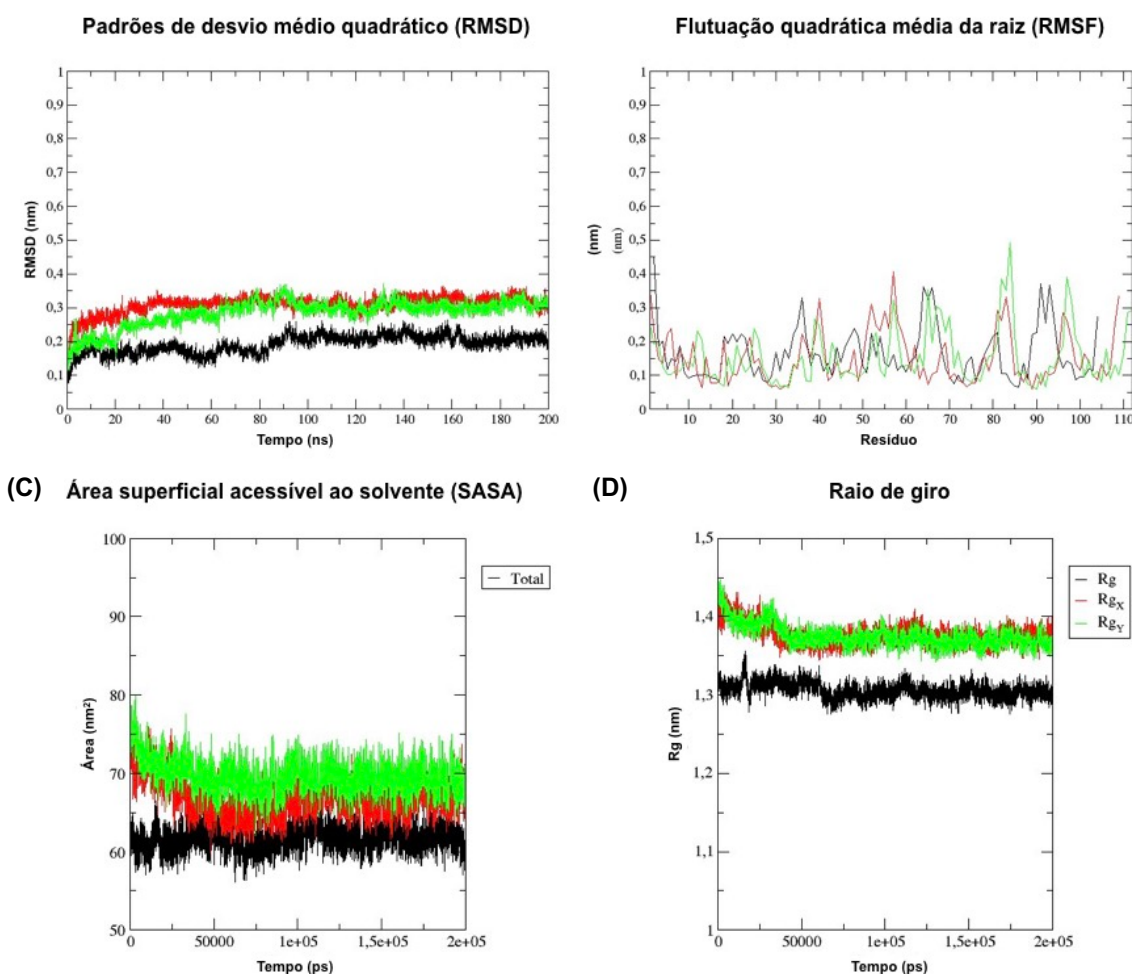


Figura 8. Análise de dinâmica molecular dos receptores TIM1 (em preto), TIM3 (em vermelho) e TIM4 (em verde). Os valores de RMSD (A) em razão to tempo (200ns) evidenciaram uma alta estabilidade de todos os sistemas, com desvios próximos de zero. TIM1 demonstrou o menor valor de RSMD (e, portanto, maior estabilidade), seguido por TIM4 e TIM3. TIM1 também demonstrou menores valores de RMSF (B), SASA (C) e raio de giro (D).

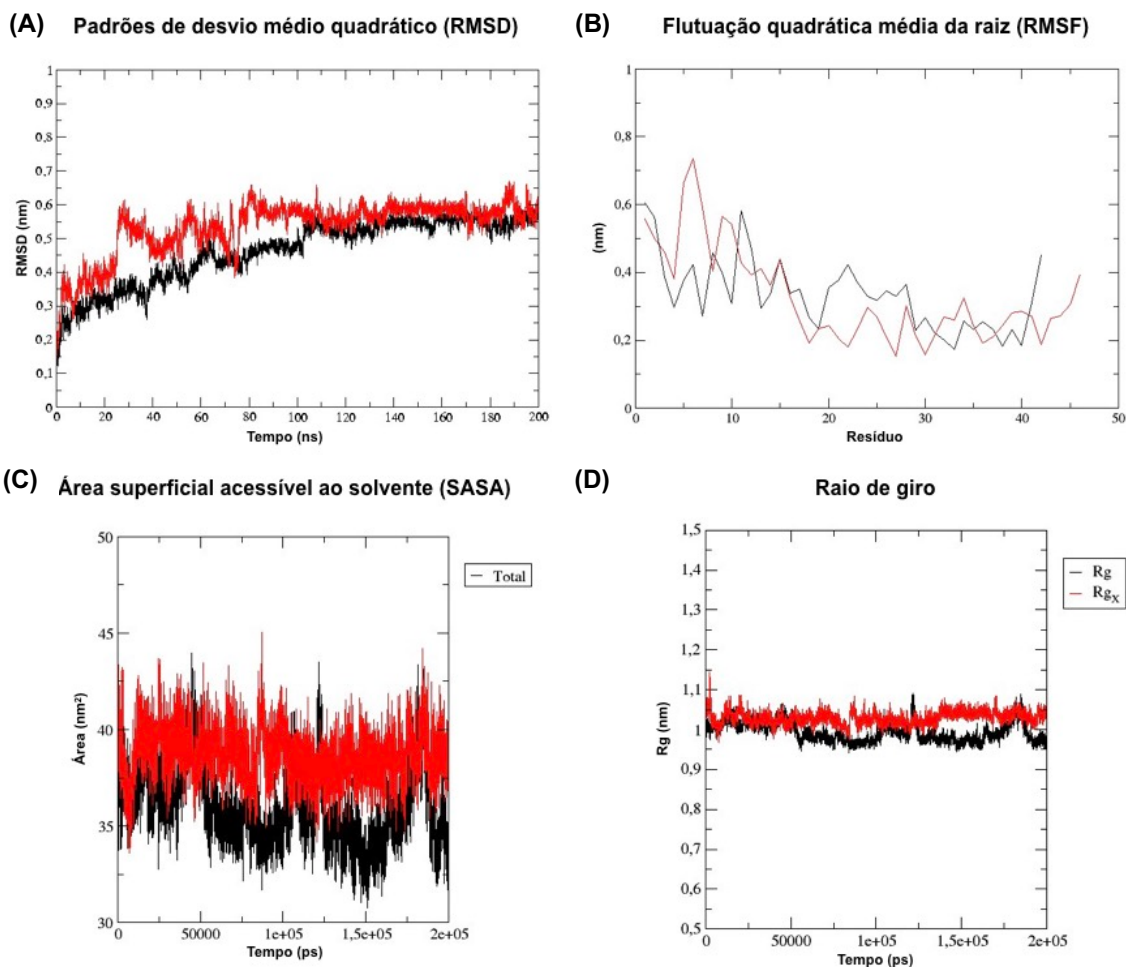


Figura 9. Análise de dinâmica molecular das moléculas adaptadoras dos receptores TAM: GAS6 (em preto) e PROS (em vermelho). GAS6 demonstrou menores valores de RMSD (A), de RMSF (B), SASA (C) e raio de giro (D).

É importante evidenciar que todos os receptores da família TIM demonstraram mais estabilidade de ligação (com valores de RMSD variando entre 0,2 e 0,3nm) com a PS do que os receptores TAM (com valores de RMSD variando entre 0,5 e 0,6nm).

De uma forma geral, os receptores de PS exibiram valores de ΔG mais baixos do que os CLRs. Estes achados sugerem que as ligações mediadas por PS são mais propensas a induzir endocitose do que as mediadas por NAG, o que fortalece a hipótese de que a liberação de partículas virais parcialmente imaturas exibindo PS, é favorável a infectividade do ZIKV. Em macrófagos, por exemplo, que possuem altos níveis de expressão de CRLs e de receptores de fosfatidilserina, a entrada do vírus tenderia a ser mediada por receptores de fosfatidilserina. Quando comparado com outros CLRs, L-SIGN mostrou ter a ligação mais estável com NAG.

A heterogeneidade das partículas virais submete os receptores celulares à diferentes opções de ligação. Para relacionar o grau de maturidade da partícula viral com sua provável via de entrada nas células, a estabilidade dos complexos proteína-proteína de CLRs com as proteínas E e prM glicosiladas foi medida, através da análise de forças de van der Waals e interações eletrostáticas (VdW + Elec). A análise da glicosilação da prM demonstrou que seu local mais provável de glicosilação é no resíduo Asn70 (**Figura 10B**), situado na metade C-terminal ancorada na membrana (**Figura 10A**), a qual é exposta na superfície viral em partículas imaturas e, portanto, tem o potencial de interagir com receptores de entrada de células hospedeiras. Esse achado acorda com os resultados descritos por YE et al., 2016.

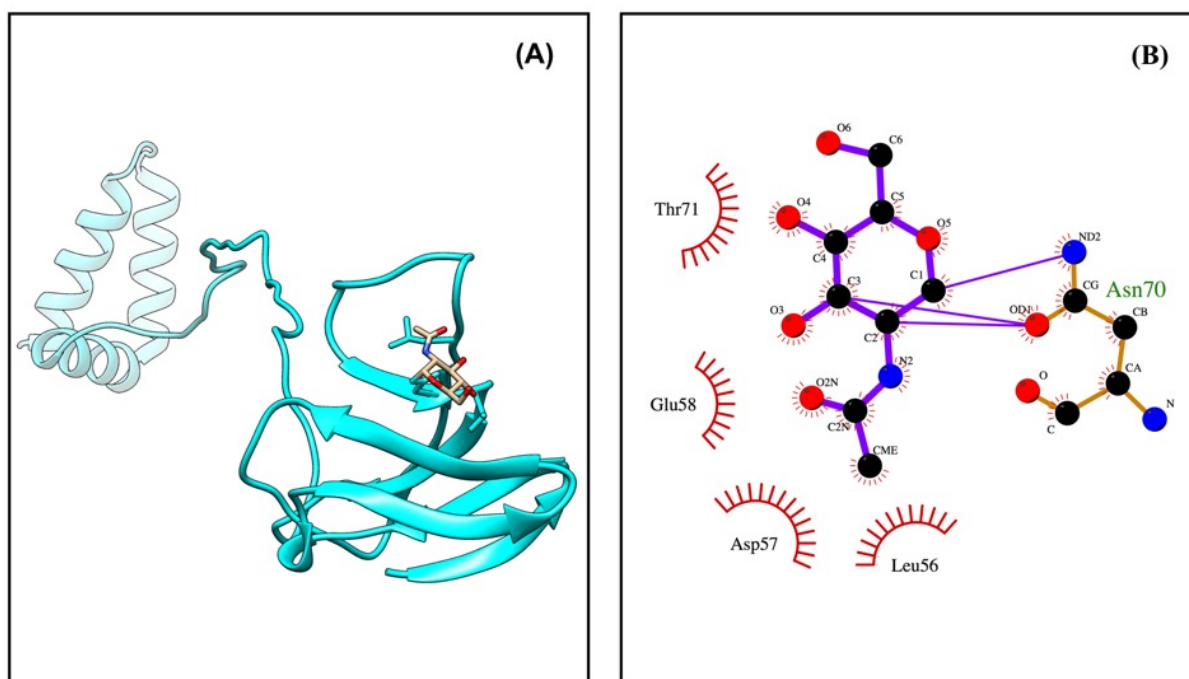


Figura 10. (A) Estrutura final da prM glicosilada com NAG; (B) LIGPLOT das interações de ligação entre NAG e prM. Os arcos com espinhos vermelhos representam interações hidrofóbicas. As linhas roxas mostram o resíduo Asn70 da prM em ligação direta com NAG.

A maioria dos CLRs (DC-SIGN, L-SIGN e CLEC5A) mostraram maior estabilidade de ligação com a proteína glicosilada prM do que com a proteína glicosilada E (**Tabela 2**), sugerindo que as partículas parcialmente imaturas, que exibem quantidades consideráveis de prM não-clivada e também PS, têm maior capacidade de adesão às células e podem aumentar o potencial de infectividade do ZIKV.

Tabela 2. Estabilidade dos complexos proteína-proteína entre CRLs e proteínas E e prM glicosiladas com uma molécula de NAG cada.

Receptor de lectina do tipo C	Estabilidade dos complexos proteína- proteína (VdW + Elec)	
	LIGANTES	
	Proteína E glisossilada	Proteína prM glisossilada
DC-SIGN	-257,2	-304,5
L-SIGN	-285,5	-347,4
MMR	-328,4	-317,1
CLEC5A	-317,3	-337,3

VdW= Forças de van der Waals

Elec= Interações eletrostáticas

DC-SIGN= Proteína não-integrina de captura intercelular específica de célula dendrítica

L-SIGN= Ligante de molécula de adesão intercelular não-integrina específica de fígado/linfonodo

MMR= Receptor de manose

CLEC5A= Membro A da família do domínio da lectina tipo C 5

Dentre os CLRs, L-SIGN mostrou possuir o maior número de ligações de hidrogênio com a prM (**Figura 11**), o que está de acordo com as medidas de estabilidade (ΔG) encontradas nas análises de docking antecedentes. O resíduo Arg89 da prM demonstrou ser o resíduo mais envolvido nas interações entre prM e CLRs, formando ligações de hidrogênio com DC-SIGN, L-SIGN e MMR.

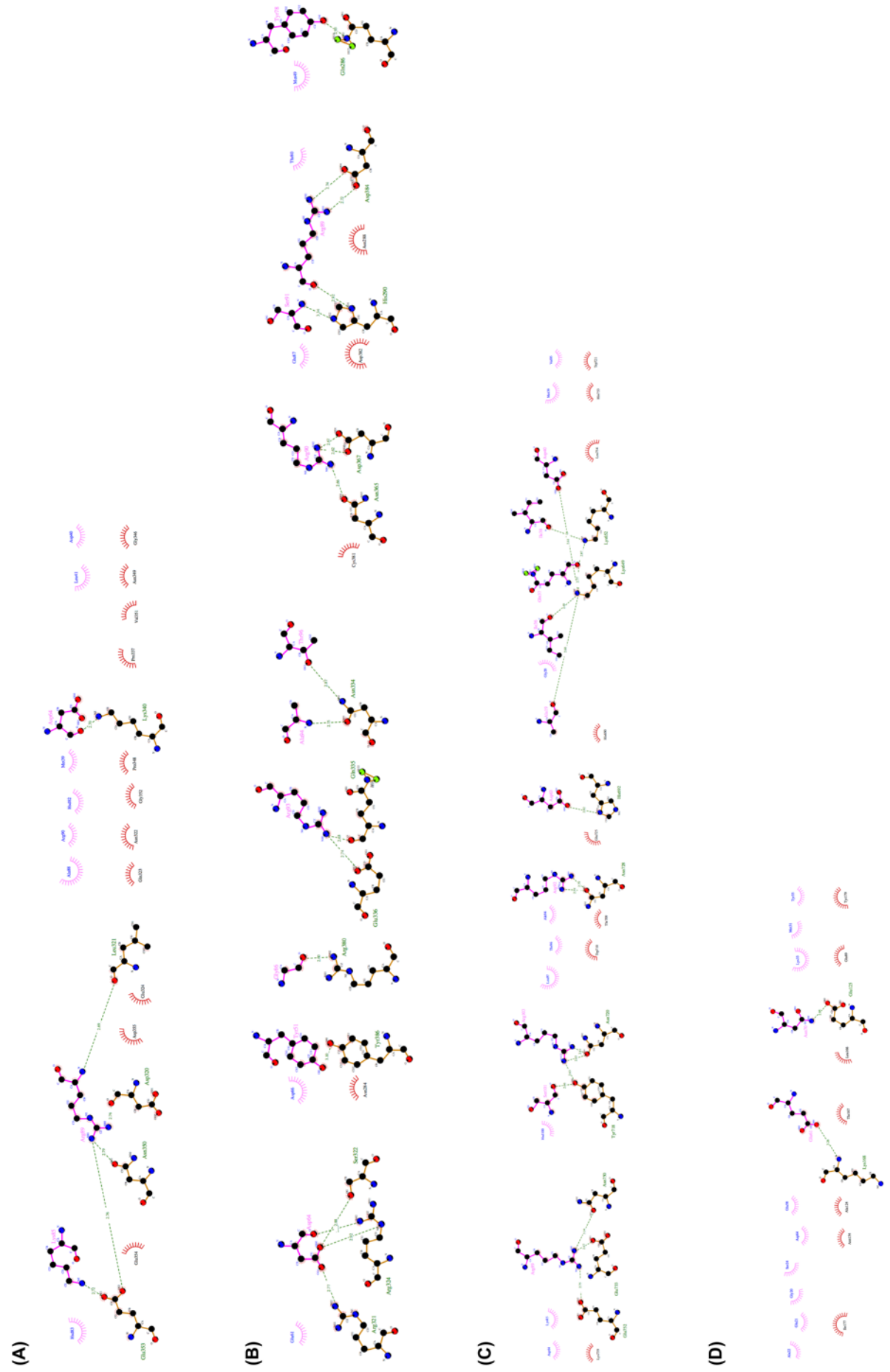


Figura 11. LIGPLOT da comparação de interações da glicoproteína prM com DC-SIGN (A), L-SIGN (B), MMR (C) e CLEC5A (D). Os arcos espinhosos representam interações hidrofóbicas entre a prM (em rosa) e CLRs (em vermelho). As linhas pontilhadas verdes indicam ligações de hidrogênio. Os resíduos Glu353, Asn350, Asp320, Leu321, Lys340 da DC-SIGN interagem com os resíduos Lys85, Arg89, Asp64 da prM por ligações de hidrogênio. Os resíduos Arg321, Arg324, Ser322, Tyr386, Arg380, Glu336, Gln335, Asn334, Asn365, Asp367, His290, Asp384, Gln286 da L-SIGN interagem com os resíduos Asp64, Tyr51, Gly86, Arg93, Ala94, Thr96, Arg90, Ser91, Arg89, Tyr78 da prM por ligações de hidrogênio. Os resíduos Glu752, Glu733, Asn750, Tyr718, Asn720, Asn728, His692, Lys649, Lys652 de Asn728, His692, Lys652 da MMR interagem com os resíduos Arg89, Ser101, Arg103, Arg92, Asp63, Ala19, Ile36, Gln37, Ile38, Asp40 prM, Ile36, Gln37, Ile38, Asp40 da prM por ligações de hidrogênio. Os resíduos Lys168 e Glu125 da CLEC5A interagem com os resíduos Glu61 e Asn70 da prM, respectivamente, também por ligações de hidrogênio.

Um estudo recente mostrou que uma única mutação (S139N) na proteína prM aumenta a infectividade do ZIKV em células progenitoras neurais e contribui para a microcefalia fetal em camundongos (YUAN et al., 2017). Experimentos com WNV mostraram que a infecciosidade de partículas virais tratadas com um potente inibidor de furina – e que, portanto, apresentam grandes quantidades de prM não-clivada – não é alterada e, desta forma, independe da clivagem da prM para entrada nas células (MUKHERJEE et al., 2011).

DENV são particularmente ricos em partículas parcialmente maduras, uma vez que evoluíram um motivo de clivagem sub-ótimo de furina na prM, que demonstrou ter um efeito negativo na eficiência da clivagem pela furina (JUNJHON et al., 2008). A maturação parcial parece, portanto, importante na manutenção do vírus em seu ciclo ecológico natural. Considerando que a prM demonstra maior afinidade de ligação aos principais receptores celulares do ZIKV do que a proteína E, a liberação de partículas parcialmente imaturas pode ser vantajosa para a entrada do vírus em células. Além disso, as partículas parcialmente imaturas são capazes de exibir PS, permitindo o seu reconhecimento pelos receptores de fosfatidilserina, aumentando a gama das possíveis rotas de entrada do vírus. Dessa forma, o grau de maturação da partícula viral e a quantidade de prM exposta na superfície do vírus são determinantes no mecanismo de entrada do ZIKV em células e parecem resguardar processos evolutivos virais de infectividade.

4.3 ENSAIO *IN VITRO* DA MATURAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL E INFECTIVIDADE

A infectividade viral foi avaliada, após 1 hora de infecção, na ausência (controle) e presença (em diferentes concentrações: 25 e 75µM) de um inibidor de maturação viral, em diferentes concentrações de MOI (1 e 4,5). Objetivando observar a

quantidade de partículas virais que sofreram endocitose, o RNA viral foi extraído do sobrenadante (partículas virais não adsorvidas) e no lisado celular (partículas virais adsorvidas) e submetido a RT-qPCR para comparação entre os grupos. Esses resultados estão expostos na **Tabela 3**.

		Ct	Fold Change
	MOI=1		
	Controle	25,0641	
SOBRENADANTE	25µM	25,7927	0,6035
	75µM	25,9015	0,5597
	Controle	28,2347	
LISADO CELULAR	25µM	29,1885	0,5163
	75µM	28,2772	0,971
	MOI=4,5		
	Controle	21,3169	
SOBRENADANTE	25µM	20,6523	1,5851
	75µM	20,9681	1,2735
	Controle	31,6854	
LISADO CELULAR	25µM	28,7052	7,891
	75µM	32,3163	0,6458

Tabela 3. Valores médios de Ct e fold change de expressão do ZIKV para amostras de sobrenadante e lisado celular de células U87-MG nos grupos controle e tratamento com inibidor de furina em diferentes concentrações (25 e 75µM) e MOI (1 e 4,5).

Considerando o MOI=1, foi observado pouca diferença entre o controle infectado e as células pré-tratadas com inibidor de furina, tanto do isolado do sobrenadante quanto do lisado celular. Esses achados reforçam a hipótese que a maturação da partícula de ZIKV não é mandatória para infectividade viral. Nossos resultados acordam com os encontrados por MUKHERJEE et al., 2011, em um estudo com WNV, no qual células pré-tratadas com inibidor de furina demonstraram produzir partículas virais infecciosas. Contrariamente, um trabalho conduzido com DENV demonstrou que, em células LoVo (linhagem celular humana de adenocarcinoma) sem a protease furina, as partículas virais imaturas liberadas possuíam baixo potencial de infectividade (ZYBERT et al., 2008). Também conduzido com DENV, um estudo mais recente analisou a infectividade de partículas virais produzidas em células dendríticas com ausência e com superexpressão de furina, e demonstrou que, em células sem a protease, partículas com baixo potencial infeccioso eram liberadas. Consistentemente, em células com superexpressão da protease, um maior índice de

infectividade foi observado (DÉCEMBRE et al., 2014). É possível que, entre diferentes *Flavivirus*, a relação da maturação da partícula viral com a infectividade seja distinta. É importante notar que a fusão à membrana da célula hospedeira depende do pH da membrana viral e, portanto, pode variar entre diferentes cepas (SMIT et al., 2011).

Quando considerado um MOI=4,5, foi observado nos poços tratados com inibidor de furina a 25µM, um aumento de sete vezes na quantidade de vírus que sofreu adsorção. Esse resultado pressupõe que, em maiores quantidades de vírus por célula, a concentração de 25µM de inibidor de furina é ideal para que sejam liberadas partículas virais heterogêneas (exibindo não somente proteína E, mas também prM e PS), o que pode ter levado à intensificação da adesão viral às células U87-MG, que expressam em grande quantidade receptores de PS. O aumento da concentração do inibidor de furina a 75µM parece ter suprimido a infectividade, possivelmente porque levou à formação de partículas completamente imaturas e com menor potencial infeccioso.

5 CONCLUSÕES

Uma das contribuições deste trabalho foi a identificação *in silico* de mutações com impacto relevante na estabilidade das proteínas C, M, NS2A, NS2B-NS3 protease e NS3 helicase do ZIKV e que, apesar do impacto previsto na estabilidade da proteína, algumas dessas mutações estão presentes em cepas circulantes do ZIKV, o que significa que essas variantes são compatíveis com a replicação e infectividade viral. Ademais, foi observado que a proteína prM pode mediar o processo de entrada viral e que é vantajoso para o ZIKV utilizar o mecanismo de mimetismo apoptótico (mediado por PS) para entrada em células. Nesse sentido, concluímos que a liberação de partículas parcialmente maduras aumenta a quantidade de células suscetíveis ao ZIKV. Por fim, concluímos que o pré-tratamento de células gliais U87-MG com inibidor de furina não inibe a infectividade do ZIKV, o que sugere que a maturação da partícula viral não é mandatória para adesão e entrada do ZIKV em células. Mais estudos se fazem necessários para elucidar os mecanismos de infectividade, maturação e patogênese deste *Flavivirus*.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto faz parte de um projeto majoritário intitulado “FATORES GENÉTICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR VÍRUS ZIKA” e possui aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/CCS (**CAAE:** 03110818.8.0000.5208 / **Número do Parecer:** 3.135.383) (ANEXO A).

7 FONTES DE FINANCIAMENTO

O projeto recebeu financiamentos provenientes do CNPq (440371/2016-3), da Capes (88881.130808/2016-01) e do Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ADAMS, S. C. et al. Glycosylation and antigenic variation among Kunjin virus isolates. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 49–56, 1995.
- AGBULOS, D. S. et al. Zika Virus: Quantification, Propagation, Detection, and Storage. **Current Protocols in Microbiology**, v. 43, 2016.
- ALAM, A. et al. Recent trends in ZikV research: A step away from cure. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 1152–1159, 2017.
- ARAÚJO, H. R. C. et al. Aedes aegypti control strategies in Brazil: Incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.
- BARKHASH, A. V. et al. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. **Antiviral Research**, v. 93, n. 1, p. 64–68, 2012.
- BASARAB, M. et al. Zika virus. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i1049, 2016.
- BEASLEY, D. W. C. et al. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 12, p. 2221–2224, 2004.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.
- CAMPO, M. et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. n. December 2016, p. 841–857, 2017.
- CAO, R. et al. Pediatric Drug Nitazoxanide : A Potential Choice for Control of Zika. **Open Forum for Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2017.
- CARNEIRO, L. A. M.; TRAVASSOS, L. H. Autophagy and viral diseases transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 3, p. 169–171, 2016.
- CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507–524, 2016.
- CHANCEY, C. et al. The global ecology and epidemiology of west nile virus. **BioMed Research International**, v. 2015, n. Figure 2, 2015.
- CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1–13, 2016.
- CHEN, J. C. et al. Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro : implications for viral transmission in women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 139–140, 2016.
- CHOUMET, V.; DESPRÈS, P. Dengue and other flavivirus infections. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 2, p. 473–8, 467–72, 2015.
- COELHO, S. V. A. et al. Development of standard methods for Zika virus

- propagation, titration, and purification. **Journal of Virological Methods**, v. 246, p. 65–74, 2017.
- COMEAU, S. R. et al. ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 45–50, 2004.
- DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.
- DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016.
- DE PAULA FREITAS, B. et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. **JAMA Ophthalmology**, v. 344, n. 6188, p. 1173–1178, 2017.
- DÉCEMBRE, E. et al. Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 2016.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DOWD, K. A. et al. Combined Effects of the Structural Heterogeneity and Dynamics of Flaviviruses on Antibody Recognition. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 11726–11737, 2014.
- DUAN, W. et al. The crystal structure of Zika virus NS 5 reveals conserved drug targets. **The EMBO Journal**, v. 36, p. 919–933, 2017.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- ENFISSI, A. et al. Zika virus genome from the Americas. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 227–228, 2016.
- FAIRN, G. D. et al. High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. **The Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 257–275, 2011.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20 th Century. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014.
- FONTES-GARFIAS, C. R. et al. Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. **CellReports**, v. 21, n. 5, p. 1180–1190, 2017.
- GODOY, A. S. et al. Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–6, 2017.
- GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438–442, 2016.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 270–277, 2011.
- HADDOW, A. J. et al. Twelve Isolations of Zika Virus From Aedes (Stegomyia) Africanus (Theobald) Taken in and Above a Uganda Forest. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, n. 1961, p. 57–69, 1964.
- HAFIZI, S.; DAHLBÄCK, B. Gas6 and protein S Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 23, p. 5231–

5244, 2006.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HASAN, S. S. et al. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–6, 2017.

HASTINGS, A. K. et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice Article TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. **CellReports**, v. 19, n. 3, p. 558–568, 2017.

HE, S. et al. Repurposing of the antihistamine chlorcyclizine and related compounds for treatment of hepatitis C virus infection. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 282, p. 1–11, 2015.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289–295, 2012.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, p. e00055-16, 2017.

HOVING, J. C. et al. Microreview Signalling C-Type lectin receptors , microbial recognition and immunity. v. 16, n. January, p. 185–194, 2014.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757–1768, 2012.

JUNJHON, J. et al. Differential Modulation of prM Cleavage, Extracellular Particle Distribution, and Virus Infectivity by Conserved Residues at Nonfurin Consensus Positions of the Dengue Virus pr-M Junction. **Journal of Virology**, v. 82, n. 21, p. 10776–10791, 2008.

KAY, J. G. et al. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 11, p. 2198–2212, 2012.

KIM, S. Y.; LI, B.; LINHARDT, R. J. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 44, p. 1–24, 2017.

KREBS, B. B.; MESQUITA, J. F. DE. Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 20 - In Silico Analysis and Molecular Dynamics Simulation of hnRNPA1. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2016.

KUMAR, C. V. et al. Computational Analysis Reveals the Association of Threonine 118 Methionine Mutation in PMP22 Resulting in CMT-1A. **Advances in Bioinformatic**, v. 2014, 2014.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LEE, Y. et al. Dissecting the Critical Factors for Thermodynamic Stability of Modular Proteins Using Molecular Modeling Approach. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

LEMKE, G.; ROTHLIN, C. V. Immunobiology of the TAM receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 327–336, 2010.

LIN, Y. F. et al. MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2287–2291, 2016.

LIU, S. et al. Brief UltraRapid Communication AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. **Circulation Research**, v. 119, p. 1183–1189, 2016.

LOZACH, P. et al. The C Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN: receptors for viral

- glycoproteins. **Methods in Molecular Biology**, v. 379, p. 51–68, 2007.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by aedes (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2016.
- MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544–557, 2012.
- MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses Report Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **CellReports**, v. 18, p. 324–333, 2017.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L.; D RICHMAN, D. Antivirals and resistance : Advances and challenges ahead. **ScienceDirect**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2014.
- MERCER, J.; HELENIUS, A. Apoptotic mimicry : phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1209, p. 49–55, 2010.
- MERFELD, E. et al. Potential mechanisms of Zika-linked microcephaly. **WIREs Developmental Biology**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRAZIL). **Boletim Epidemiológico: Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/14/2018-061.pdf>>.
- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.
- MUKHERJEE, S. et al. The infectivity of prM-containing partially mature West Nile virus does not require the activity of cellular furin-like proteases. **Journal of virology**, v. 85, n. 22, p. 12067–72, 2011.
- MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.
- MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, v. 68, p. 53–55, 2015.
- NHAN, T.-X.; MUSSO, D. Emergence of Zika Virus. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 04, n. 05, 2015.
- NICOLA NOSENGO. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314–316, 2016.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014.
- OLIVEIRA, W. K. et al. Zika Virus Infection and Associated Neurologic Disorders in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1591–1593, 2017.
- OOSTENBRINK, C. et al. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation : The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. May, p. 1656–1676, 2004.
- PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus Entry Receptors: An Update. **Viruses**, v. 6, p. 69–88, 2014.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT

- ENDPOINTS. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.
- RETALLACK, H. et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 50, p. 14408–14413, 2016.
- REY, A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity : implications for cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 24, p. 132–139, 2017.
- ROUTHU, N. K.; BYRAREDDY, S. N. Host-Virus Interaction of ZIKA Virus in Modulating Disease Pathogenesis. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 219–232, 2017.
- RUSO, F. B.; JUNGSMANN, P.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. Zika infection and the development of neurological defects. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 6, 2017.
- SAIZ, J.; MARTÍN-ACEBES, M. A. The Race To Find Antivirals for Zika Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–9, 2017.
- SCHAFFNER, F.; FONTENILLE, D.; MATHIS, A. Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirosis in Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1044, 2014.
- SCHULER-FACCINI, L. et al. Possível associação entre a infecção pelo vírus zika e a microcefalia — Brasil , 2015. **Center for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 1–4, 2016.
- SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.
- SMIT, J. M. et al. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Virus**, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.
- SOLOMON, T.; BAYLIS, M.; BROWN, D. Zika virus and neurological disease-approaches to the unknown. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 402–404, 2016.
- TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells , Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host and Microbe**, v. 20, p. 1–12, 2016.
- TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth Brief Report Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.
- WALKER, K. F.; THORNTON, J. G. Microcephaly and Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2070–2072, 2016.
- WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. December 2016, p. 1–6, 2017.
- WANG, L. et al. DC-SIGN (CD209) promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, 2011.
- WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, n. May, p. 32–39, 2015.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010.
- WELLS, M. F. et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection Brief Report Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. **Stem Cell**, v. 19, n. 6, p. 703–708, 2016.
- XIA, H. et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 414, 2018.

- YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2014.
- YE, Q. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 43–49, 2016.
- YU, I.-M. et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 2014.
- YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 88, n. 20, p. 11726–11737, 28 set. 2017.
- YUN, S.; LEE, Y. Zika virus : An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.
- ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 24, p. 6179–6217, 2005.
- ZHANG, Y. et al. Structure of immature West Nile virus. **Journal of virology**, v. 81, n. 11, p. 6141–5, 1 jun. 2007.
- ZYBERT, I. A. et al. Communication Functional importance of dengue virus maturation : infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 2008, p. 3047–3051, 2008.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION

Artigo 2

Infection, Genetics and Evolution 69 (2019) 22–29



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Review

ZIKA virus entry mechanisms in human cells

Almerinda Agrelli^{a,*}, Ronald Rodrigues de Moura^b, Sergio Crovella^{a,b},
Lucas André Cavalcanti Brandão^{a,c}

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife CEP: 50670-901, Brazil

^b Department of Genetics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife CEP: 50670-901, Brazil

^c Department of Pathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife CEP: 50670-901, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

ZIKV
C-type lectin receptors
Apoptotic mimicry
ZIKV protein prM
ZIKV protein E

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an enveloped, mosquito-borne *Flavivirus*, which infects cells through clathrin-mediated endocytosis and fusion employing acidic endosomes. Cell entry is mostly mediated by the viral glycoprotein E, although incomplete particle maturation enables viral protein prM and anionic lipids present in the viral membrane to mediate this process. Incomplete proteolytic maturation results in a set of highly heterogeneous particles. These heterogeneous and dynamic infectious particles offer a variety of possible receptor interaction sites on their surfaces, thus contributing to the wide range of cells susceptible to ZIKV as well as to variation in tissue tropism. This review addresses recent advances in the understanding of ZIKV entry process into cells and put together fundamental questions about viral replication, maturation and host-cell interactions.

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*, closely related to several other viruses that cause disease globally, including Dengue (DENV), Yellow Fever (YFV), West Nile (WNV), Japanese Encephalitis (JEV) and Tick-borne Encephalitis Virus (TBEV) (Alam et al., 2017; Miner and Diamond, 2017; Musso et al., 2015; Wang et al., 2017a).

ZIKV was first isolated in 1947 from the serum of a sentinel Rhesus monkey at the Zika forest, in Uganda (Dick et al., 1952). The first evidence of human infection was based on the presence of neutralizing antibodies against ZIKV in 1952, and it was first linked to Zika disease in 1964 (Simpson, 1964). Nevertheless, little attention was paid to this virus until outbreaks were reported in Yap Island, Federated States of Micronesia, in 2007 (Duffy et al., 2009), and in French Polynesia, 2013 (Cao-Lormeau et al., 2014), where it was associated with Guillain-Barré Syndrome. During the outbreak in Brazil, in 2015, ZIKV was linked to neonatal microcephaly (ECDC, 2015; Schuler-faccini et al., 2016). To date, in Brazil, there were 16,735 suspected cases of changes in growth and development of children related to ZIKV infection, with 3267 (19.5%) confirmed cases (Brazil Ministry of Health, 2018). These severe clinical implications have prompted the scientific community to develop emergency interventions, since the disease pathogenic

mechanism is not yet completely understood.

ZIKV genome has ~10.7 kb, encoding 3423 amino acids, with two flanking 5' and 3' noncoding regions and a single long structure encoding a polyprotein, which is cleaved into capsid protein (C), precursor protein (prM), envelope protein (E) and 7 non-structural proteins (NS): 50-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-30 (Dikhit et al., 2016; Göertz et al., 2017). Viral envelope protein E intermediates membrane fusion by receptor-mediated endocytosis mostly through C-type lectin receptors family from the host-cell (Dai et al., 2016; Kim et al., 2017a). Although, cellular lipid receptors, such as TIM (T-cell immunoglobulin mucin) and TAM (Receptor tyrosine kinases: TYRO3, AXL and MER) receptor families (which recognize lipids in the viral membrane) showed to mediate ZIKV entry (Hastings et al., 2017; Liu et al., 2016; Meertens et al., 2017).

The molecules used by ZIKV in entry process depend on the pattern of proteins expressed in viral particle lattice and therefore appear to rely on the degree of particle maturation (Pierson and Diamond, 2013). Furthermore, cell type plays a major role in this mechanism (Perera-lecoine et al., 2014). Studies *in vivo* showed that cells of the reproductive tract (spermatogonia, sperm, Sertoli and Leydig cells) (Govero et al., 2016) and from cerebral cortex and hippocampus (Wang et al., 2017b) are permissive to ZIKV infection in mice. More importantly, using an *in vitro* approach, cell culture experiments demonstrated the ability of

* Corresponding author.

E-mail addresses: almerinda.agrelli@ufpe.br (A. Agrelli), ppgg@ufpe.br, ronald.moura@ufpe.br (R.R. de Moura), sergio.crovella@ufpe.br (S. Crovella), dpatologia@ufpe.br, lucas.cbrandao@ufpe.br (L.A.C. Brandão).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>

Received 23 August 2018; Received in revised form 29 November 2018; Accepted 14 January 2019

Available online 15 January 2019

1567-1348/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

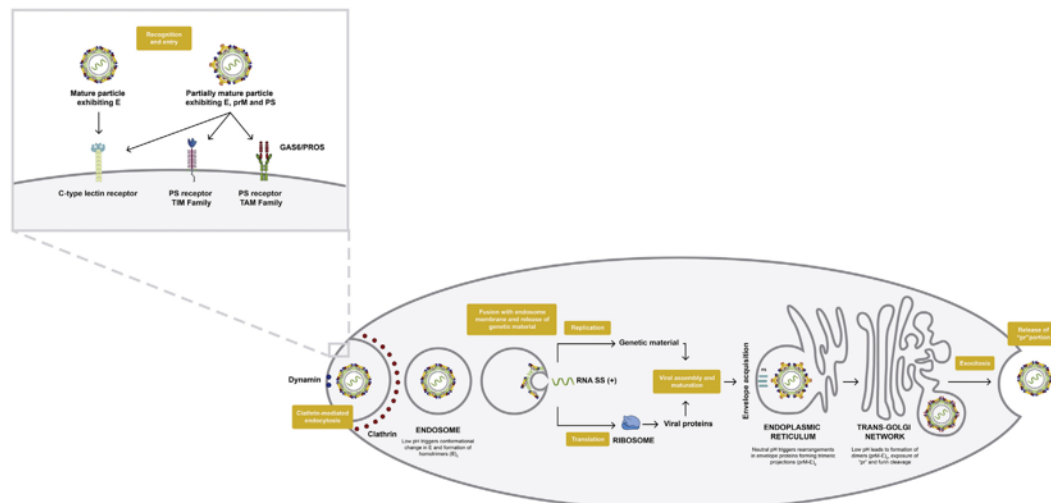


Fig. 1. ZIKV processes of attachment and entry, replication, translation, assembly, maturation and release from infected cells.

ZIKV to infect human cells, such as skin fibroblasts (Hamel et al., 2015), uterine fibroblasts (Chen et al., 2016), primary placental trophoblasts and Hofbauer cells (Aagaard et al., 2017; Quicke et al., 2016), endometrial stromal cells (Pagani et al., 2017), and neural progenitor cells (Dang et al., 2016; Tang et al., 2016). These findings hold for an extensive set of cells susceptible to ZIKV infection and therefore a robust number of receptors involved in viral entry process. In this review, we discuss viral maturation and heterogeneity in the context of ZIKV entry, highlighting recent advances in the understanding of molecular mechanisms involved in viral infectivity.

2. CLATHRIN-mediated endocytosis

The main mechanism by which *Flavivirus* infiltrate human host cells is clathrin-mediated endocytosis, which is followed by a change in envelope conformation, membrane fusion and release of the viral genome (Fig. 1) (Cruz-Oliveira et al., 2015; Hackett and Cherry, 2018). Clathrin-mediated endocytosis is a vesicular trafficking process that transports cargo molecules from the cell surface to its interior, and generally occurs at specialized sites, where a “coated pit” structure is assembled in order to concentrate surface proteins for internalization (Mousavi et al., 2004). This process (named after the most abundant protein found in coated pits: clathrin) is mostly involved in physiological processes, such as nutrient uptake, cell signaling and adhesion, etc., however, the same mechanism has shown to be used by viruses, including ZIKV (Persaud et al., 2018), to enter cells (Kaksonen and Roux, 2018).

Initially, during viral infection, viral particles diffuse along the cell surface toward a pre-existing clathrin-coated pit. This implies that viruses either roll over distinct binding factors until they bind to the input receptor (located in clathrin hotspots on the cell surface), or that the initially formed virus-receptor complex is transported to a pre-existing clathrin-coated pit (Smit et al., 2011). Subsequently, the clathrin-coated pit evolves and invagination at the plasma membrane is closed by excision of the dynamin-mediated membrane to form a clathrin-coated vesicle. This vesicle is transported away from the plasma membrane, and then the clathrin coating is released from it. After clathrin-mediated uptake, the endocytic vesicle carrying the virus is delivered to the initial endosomes, which mature into late endosomes,

and then the viral membrane fuses with the endosome membrane so viral RNA is released into the cytoplasm (Mercer et al., 2010). It is important to note that membrane fusion on the host cell depends on the pH of the viral membrane and therefore may vary between different strains (Chu and Ng, 2004; Cruz-Oliveira et al., 2015).

3. Attachment factors and entry receptors

It is likely that receptor binding and recognition is a process where multiple molecules are used in combination for infectious entry (Kaufmann and Rossmann, 2012; Kim et al., 2017a; Mercer et al., 2010). The surface of ZIKV mature particle is typically covered by homodimers of protein E (E)₂, arranged in an icosahedral format (Sirohi et al., 2016). Individual interactions with human receptors are generally weak, but contact with multiple receptors makes avidity higher and the bind becomes stronger (Mercer and Helenius, 2010). It is important to distinguish entry receptors - interactions that result in virus uptake - from attachment factors, which will only retain viral particles on cell surface until there is interaction with an entry receptor (Kim et al., 2017a). Generally, receptors promote endocytosis and accompany the virus into the cell (Kaufmann and Rossmann, 2012). Therefore, entry starts with binding to attachment factors, followed by associations with one or more receptors.

The most commonly encountered attachment factors are negatively charged glycosaminoglycans (GAGs), such as heparan sulfate and chondroitin sulfate (Kim et al., 2017a), which can be utilized by several flaviviruses, including DENV (Hilgard and Stockert, 2000; Thepparit et al., 2004), WNV (Lee et al., 2004), JEV (Lee et al., 2004; Su et al., 2001) and TBEV (Kroschewski et al., 2003), as low-affinity attachment factors that concentrate the virus on the cell surface. Binding to these negatively charged polysaccharides is usually electrostatic and relatively nonspecific (Mercer et al., 2010). A surface plasmon resonance analysis that explored binding between GAGs prepared from placenta and protein E suggested that ZIKV may utilize GAGs as attachment factors for host cell entry, as other pathogenic flaviviruses (Kim et al., 2017b).

ZIKV entry into target cells is mostly mediated by interaction of N-glycans conjugated to protein E with cell surface receptors of the host cell (Hasan et al., 2017; Heinz and Stiasny, 2017). Protein E is the

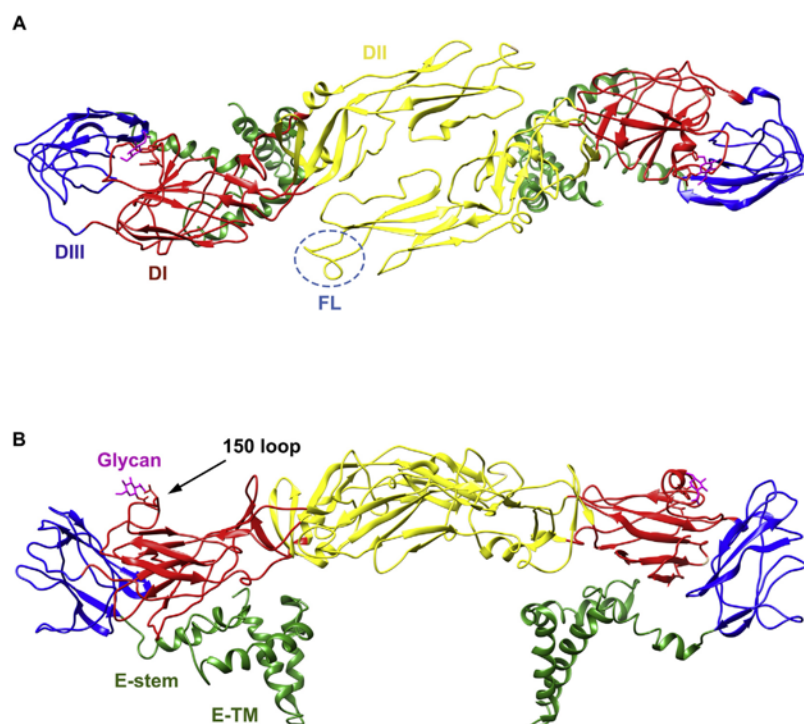


Fig. 2. Structure of ZIKV E protein dimers (PDB id code: 5IZ7). (A) E protein domains I (red), II (yellow) and III (blue). Fusion loop (FL) is evidenced in the dotted circle. (B) Stem-transmembrane domain that anchors the protein into the membrane is shown in green. The glycosylation site (with the glycan, in pink) is found in the 150 loop region. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

largest viral surface protein, being involved in membrane binding and fusion processes (Hasan et al., 2017; Shi and Gao, 2017). In ZIKV, protein E is N-glycosylated after the translation process at position Asn154 (asparagine, at position 154) within a highly conserved N-X-T/S sequence glycosylation motif (in which N is asparagine, T is threonine and X is any standard amino acid, except proline) at positions 154–156, indicating the biological importance of this modification (Fontes-garfias et al., 2017). However, other *Flavivirus* do not exhibit such glycosylation, suggesting that protein E function can be achieved without N-glycan (Adams et al., 1995; Beasley et al., 2004).

Similar to other *Flavivirus*, ZIKV protein E has four domains: the stem-transmembrane domain, which is responsible for membrane anchoring; and domains I, II and III, which constitute the predominantly β -strand surface part of the protein (Heinz and Stiasny, 2017; Ye et al., 2016).

Domain I (DI) of protein E acts as a bridge between domains II (DII) and III (DIII) (Fig. 2a). The tip of DII contains the fusion loop (FL), which interacts with the host membrane during membrane fusion and is the most conserved structural element in this protein among all *Flavivirus* (Heinz and Stiasny, 2012). FL is responsible for the broad antibody cross-reactivity observed among all *Flavivirus* and plays an important role as an antigenic site that contributes to antibody-mediated enhancement of infection. A study based on chemical cross-linking and immunoassays demonstrated that monoclonal antibodies recognize epitopes at the interface of the dimeric envelope protein E, cause dimer dissociation and lead to the exposure of FL in TBEV and DENV (Haslwanter et al., 2017). Under usual infection conditions, this process

is only triggered after the virus contact with the acidic pH of endosomes, resulting in membrane fusion through the interaction of FL with the endosomal membrane (Mercer et al., 2010; Smit et al., 2011). This exposure of FL at neutral pH may mediate attachment of the virus to the plasma membrane, thereby increasing viral infectivity.

Receptor-binding site is localized on DIII, being of great importance in the fusion process. Curiously, ZIKV has a single glycosylation site (Asn154) on DI of protein E (Fig. 2b), which protrudes from the surface, because ZIKV E-DI has a longer “150 loop” (residues 145–160) compared to other flaviviruses. This 150 loop region varies not only between ZIKV strains but also in other *Flavivirus*, suggesting that variations in this region influence viral infectivity (Shi and Gao, 2017).

Virions are not static structures and undergo concerted fluctuations at equilibrium, a phenomenon referred to as viral “breathing” (Lewis et al., 1998). More recent evidence indicates that metastability of the E dimers gives rise to a dynamic motion, in which they transiently expose otherwise buried surfaces (Kuhn et al., 2015). These structural dynamics of the surface of the virus transiently expose the E-sites that would be inaccessible in a static viral particle with a closed envelope of 90 E dimers in a fishbone arrangement, as determined by cryo EM (Kostyuchenko et al., 2016). Dynamics of fully and partially mature particles may thus facilitate interactions with cellular attachment factors and entry receptors.

4. C-type lectin receptors

The innate immune system is responsible for the body's first line of

defense against microbial attack and it is induced by the recognition of microbial components, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Such recognition initiates signaling cascades that induce the intracellular innate immune defenses and the inflammatory response which facilitates the development of the acquired immune response (Hoving et al., 2014; Kell and Gale Jr, 2015). Viruses are recognized by human pattern recognition receptors (PRRs) through their nucleic acids, such as double (dsRNA), single stranded-RNA (ssRNA), and DNA, although envelope glycoproteins on surface of viral particle can also be recognized as PAMPs (Hoving et al., 2014).

C-type lectin receptors (CLRs) comprise a large family of carbohydrate receptors, which bind through one or more carbohydrate recognition domains (CRDs), and is divided into 17 groups taking into account features such as phylogeny and structure (Zelensky and Gready, 2005). Several members of this family are highly expressed in myeloid cells, including monocytes, macrophages and dendritic cells, thus playing a central role in the activation of the host immune system (Kim et al., 2017a).

CLRs recognize carbohydrate profiles in pathogens and act as PRRs for the internalization of these agents, directing them to endosomes, initiating the process of antigen presentation and elimination of the pathogen (Cambi et al., 2005). The most implicated CLRs in *Flavivirus* entry are DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) (Hacker et al., 2009; Lozach et al., 2005; Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003), L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin) (Navarro-Sanchez et al., 2003; Wang et al., 2016), MMR (Macrophage mannose receptor) (Miller et al., 2008) e CLEC5A (C-type lectin member 5A) (Chen et al., 2008).

DC-SIGN showed to permit ZIKV entry into cells (Hamel et al., 2015). Additionally, *in vitro* analysis carried out with different cell lineages revealed similar results with DENV (Alen et al., 2009; Hacker et al., 2009; Lozach et al., 2005; Tassaneetrithep et al., 2003), WNV (Davis et al., 2006b; Martina et al., 2008) and JEV (Shimojima et al., 2014), whereas L-SIGN demonstrated to enable cell entry only for WNV (Davis et al., 2006b) and JEV (Shimojima et al., 2014). Studies have identified a single nucleotide polymorphism in the promoter sequence of DC-SIGN gene (CD209) that is strongly associated with predisposition to dengue hemorrhagic fever (rs4804803) (Wang et al., 2011) and severe forms of tick-borne encephalitis (rs2287886) (Barkhash et al., 2012), which reinforces the involvement of this receptor in *Flavivirus* tropism.

DC-SIGN and its close homologue L-SIGN are group II (calcium-dependent with single CRD) transmembrane C-type lectins and interact through their CRD domains with carbohydrates bound to viral protein E (Cruz-Oliveira et al., 2015; Zelensky and Gready, 2005). Their extracellular domains share common structural motifs, including an extended neck composed of tandem repeats of a highly conserved 23-amino acid sequence, which is followed by a CRD that binds mannose-rich glycans and plays an important role in entry mechanisms of *Flavivirus* into myeloid cells (Khoo et al., 2008). DC-SIGN is highly expressed in some subsets of immature macrophages and dendritic cells, suggesting a possible facilitation in viral dissemination (Hamel et al., 2015; Kay et al., 2012; Smit et al., 2011). Contrarily, L-SIGN expression is restricted to sinusoidal endothelial cells of the liver and endothelial cells of lymph nodes (Tassaneetrithep et al., 2003), however its role during the course of infection has not yet been established (Perera-lecoin et al., 2014).

MMR is a group VI (calcium-dependent with multiple CRDs) CLR that has been proposed to be a functional entry receptor for *Flavivirus* (Hafizi and Dahlbäck, 2006). Unlike DC-SIGN and L-SIGN, MMR has several CRD domains and a cysteine-rich domain at the end of its extracellular domain that is capable of interacting with sulfated sugars (Hamel et al., 2015; Martinez-pomares, 2012). MMR is essentially expressed in macrophages, but can also be found in lymph nodes and endothelial cells of the liver, in kidney cells and in some dendritic cells

populations (Martinez-pomares, 2012) - all relevant to *Flavivirus* infection. This receptor demonstrated to bind protein E of four DENV serotypes and was proposed as a DENV internalization receptor in human primary macrophages, since anti-MMR polyclonal antibodies inhibit virus infection (Dejnirattisai et al., 2016). CLEC5A is a group V CLR (calcium-independent with single CRD) (Kim et al., 2017a), which is expressed in monocytes and macrophages and has showed to mediate the entry of DENV (Chen et al., 2008) and JEV (Chen et al., 2012) into cells. Even though strong evidence link L-SIGN, MMR and CLEC5A to *Flavivirus* entry, we did not find in literature studies relating these receptors particularly in ZIKV entry process. Nevertheless, considering the similarity between these viruses, it is possible that ZIKV explores multiple CLRs for entry and greater viral spread.

5. Entry mediated by negatively charged lipids

Previous studies indicate that the entry process of flaviviruses, including ZIKV, may be mediated by interactions that do not involve protein E, but occur between negatively charged lipids, such as phosphatidylserine (PS), present in the viral membrane (Cruz-Oliveira et al., 2015; Hafizi and Dahlbäck, 2006; Hamel et al., 2015; Heinz and Stiasny, 2017; Meertens et al., 2012; Perera-lecoin et al., 2014). These anionic lipid cell receptors belong to two distinct families of transmembrane phosphatidylserine receptors: TIM (TIM1, TIM3 and TIM4) and TAM (TYRO3, AXL and MER) (Kay et al., 2012; Lemke and Rothlin, 2010; Meertens et al., 2012).

On the contrary of TIM receptors, TAM receptors do not bind directly to PS, but indirectly, through a process that requires the presence of GAS6 (Growth-arrest-specific 6) or PROS (Protein S), which act as bridging molecules (Hafizi and Dahlbäck, 2006; Lemke and Rothlin, 2010; Meertens et al., 2012). The physiological function of these receptors is to recognize negatively charged lipids in apoptotic cells and trigger endocytosis by phagocytic cells (Fairn et al., 2011; Mercer and Helenius, 2010). This process of “kidnapping” was previously identified in a large number of viruses and is called “apoptotic mimicry” (Amara and Mercer, 2015).

As *Flavivirus* sprouts in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) during morphogenesis, the viral membrane ends up reflecting the ER membrane composition, which has PS in its luminal leaflet. The plasma membrane of living cells normally does not contain negatively charged lipids in the external leaflet due to the presence of specific enzymes called “lipid flippers” that assure the asymmetry of the plasmatic membrane by keeping these lipids only in the internal leaflet (Fairn et al., 2011; Kay et al., 2012).

The role of phosphatidylserine receptors in the entry of *Flavivirus* into cells was first identified in DENV studies, but several evidences suggest that ZIKV can also use apoptotic mimicry to infect different human tissues, including skin cells (Hamel et al., 2015), endothelial cells (Liu et al., 2016), neural cells (Retallack et al., 2016; Tang et al., 2016; Wells et al., 2016), and placenta cells (Tabata et al., 2016). A study carried out with a TAM-knockout mice demonstrated that these molecules are not necessary for ZIKV infectivity and virus replication has not been affected in the spleen, placenta, vagina and brain (Hastings et al., 2017). The data corroborate with previous observations (Govero et al., 2016) and suggest that there may be redundancy of ZIKV input receptors in cells.

Interestingly, a recent case series where placental tissues (from women who had laboratory-confirmed ZIKV during pregnancy) were analyzed showed that Hofbauer cells sustain the presence of the virus in the placenta until birth and may provide a viral source for continued infection (Noronha et al., 2018). Additionally, a sophisticated model of uterine-placental route of transmission was suggested by Tabata et al., 2016. This model proposes that ZIKV may disseminate by infecting invasive cytotrophoblasts (CTBs), which leave from chorionic villus of the placenta and surpass uterine wall to remodel uterine arteries. Once in contact with maternal infected blood, CTBs get infected and may

infect trophoblast progenitor cells in the chorionic membrane and then amniotic epithelial cells in the amniotic membrane. Thus, virions released into amniotic fluid may infect cells from the fetus. This elegant work also reported that TIM1 plays a critical role in the uterine-placental interface once its inhibitor blocked ZIKV infection *in vitro*. These data reinforce the involvement of phosphatidylserine receptors in ZIKV entry mechanism and raise questions on the possibility of an underlying cell-to-cell transmission mechanism. Further investigations on virological synapses are required to elucidate ZIKV infectivity processes.

6. Role of particle maturation in ZIKV infectivity and prM as a putative entry receptor

Maturation of *Flavivirus* from immature particles (C, prM and E) to mature form (C, M and E) occurs during viral exocytosis of an infected cell (Dowd et al., 2014). During entry into the host cell, the acidic endosomal environment triggers an irreversible conformational change in protein E and a transition from a homodimer (E_2) to a homotrimer (E_3) formation - the final, lowest-energy conformation of E, which leads to membrane fusion and release of viral genetic material and further replication and translation processes (Yu et al., 2014). In ER, during particle assembly process, the immature newly assembled particle exhibits a spiny surface, with 180 prM-E heterodimers associated into 60 trimeric projections (prM- E_3) (Fig. 3a). During viral maturation, the low pH within the trans-Golgi network induces a reorganization of (prM- E_3) trimeric projections into 90 dimers (prM- E_2) (Yu et al., 2014). This structural rearrangement exposes the cleavage site of prM to be digested by the host protease, furin (Heinz and Stiasny, 2012). The “pr” portion cleaved from prM remains associated with the virus until the cell is released, where it finally dissociates, due to the neutral pH of the extracellular medium (Zhang et al., 2007).

Fully mature particles incorporate proteins E (E_2) and M (M_2) as 90 homodimers each (Fig. 3b), arranged in closely packed protein shell with a herringbone pattern, and lacking non-cleaved prM protein (Yu et al., 2014). Several lines of evidence indicate that cleavage of prM may be inefficient and that infectious viral particles released from the cells may have non-cleaved prM. The resulting particles, therefore, exhibit a heterogeneous architecture, exposing both mature and immature particle structure (Fig. 3c) (Rey et al., 2017; Yu et al., 2014).

Heterogeneity of viral particles appears to be necessary for the use of apoptotic mimicry in the entry process of ZIKV into cells because the viral membrane containing PS would not be accessible in the mature viruses (Smit et al., 2011). We did not find any reports in literature about *in vitro* assays that exploited the maturation status of ZIKV particles to their phosphatidylserine receptor-mediated entry ability. It must be noted that different *Flavivirus*, or even different strains of the same virus, are likely to demonstrate different degrees of membrane exposure and may therefore differ in the use of entry lipid receptors.

The release of partially mature but infectious particles suggests that

prM or prM-E complex exposed on the surface of these particles could mediate viral entry process (Heinz and Stiasny, 2017). DENV has previously shown to be particularly rich in partially mature particles, since a sub-optimal furin cleavage motif in prM has evolved, exhibiting a conserved amino acid residue at the P3 cleavage position, which has shown to have a negative effect on the efficiency of furin cleavage (Junjhon et al., 2008). Thus, partial maturation seems to be important in the maintenance of viral ecological cycle. Another study conducted with WNV has demonstrated that N-glycosylated prM can mediate viral entry into cells via DC-SIGN (Davis et al., 2006a). A single mutation in prM (serine to asparagine substitution at position 139) has been associated with the ability of ZIKV to infect cells (Yuan et al., 2017), suggesting that prM could also act as an entry receptor.

6.1. Inhibition of ZIKV entry

Since ZIKV infection has become a serious public health issue, many efforts have been made to develop an anti-ZIKV drug. In this regard, many molecules demonstrated to be promising inhibitors of different stages of ZIKV's life cycle, such as viral entry, replication, maturation and release of infectious particles, although until date there is still no specific drug or vaccine against ZIKV infection (Munjal et al., 2017).

Concerning ZIKV entry, some molecules are known to block early viral mechanisms: by interfering with receptor binding or inhibiting internalization by endocytosis. Studies *in vitro* performed on different cell lines showed that curcumin (Mounce et al., 2017), nanchangmycin (Rausch et al., 2017), ZINC33683341 and ZINC49605556 (Sandun et al., 2016) molecules inhibit viral entry by blocking receptor binding, while compounds such as chloroquine (Li et al., 2017b; Shiryayev et al., 2017), suramin (Albulescu et al., 2017; Tan et al., 2017) and 25-hydroxycholesterol (Li et al., 2017a) demonstrated to inhibit ZIKV internalization *in vitro* and *in vivo*. Chloroquine's is controversial about its mechanism of action, whether if it is in viral entry or autophagic flux. Several tests *in vitro* and *in vivo* were carried out on both perspectives and appear to evidence a double mechanism for this drug (Cao et al., 2017; Li et al., 2017b; Liang et al., 2016; Shiryayev et al., 2017; Zhang et al., 2017). Apart from blocking receptor binding by targeting AXL, nanchangmycin also seems to play a double role by inhibiting clathrin-mediated endocytosis (Rausch et al., 2017). Further, arbutol, a well-known antiviral of broad-spectrum, showed to prevent an early step of ZIKV's lifecycle *in vitro*, although its precise mechanism of action is not well known yet (Fink et al., 2018). Epigallocatechin gallate (EGCG), a compound largely present in green tea, demonstrated to considerably reduce ZIKV infectivity in Vero cells, however its action seems to be viricidal by directly interacting with ZIKV's envelope (Carneiro et al., 2016). Additional tests with these drugs are clearly necessary for the development of a safe and effective treatment against ZIKV. We summarized the mechanisms of these anti-ZIKV drugs in Table 1.

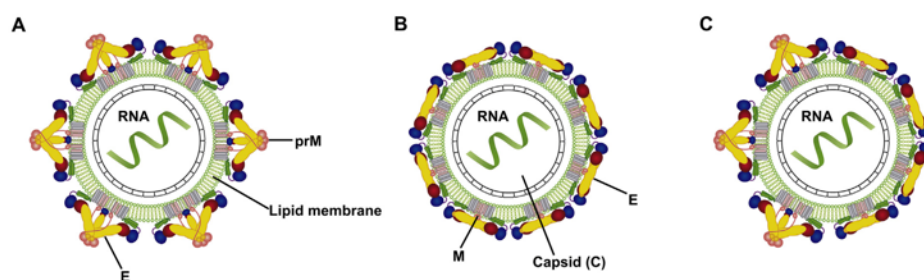


Fig. 3. Viral particle possible structures. (A) Immature particle displaying trimeric projections (prM- E_3) due to neutral pH of endoplasmic reticulum. (B) Mature particle displaying E (E_2) and M (M_2) homodimers after complete cleavage by furin and secretion from host cells. (C) Heterogeneous particle structure.

Table 1
List of potential inhibitors of early stage in ZIKV infection.

Compound	Study model	Effects	Putative mechanism of action	Reference
Arbidol	<i>In vitro</i>	Inhibits viral infection of primary vaginal (HVE2) and cervical epithelial cells (ENDO and ECTO cells) and reduces the production of progeny virions	Inhibits an early step in viral lifecycle	(Fink et al., 2018)
Chloroquine	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Inhibits viral infection <i>in vitro</i> (BHK-21, Huh7 and Vero cells) and attenuates ZIKV-associated morbidity and mortality in mice	Blocks viral internalization	(Li et al., 2017b)
Curcumin	<i>In vitro</i>	Reduces infectivity in HeLa, BHK-21 and Vero cells	Inhibits viral entry by interfering with the binding of protein E	(Mounce et al., 2017)
EGCG	<i>In vitro</i>	Reduces infectivity in Vero cells	Viricidal effect probably by direct interaction of the drug with lipid envelope, leading to a subsequent destruction of the virus particle	(Carneiro et al., 2016)
Nanchangmycin	<i>In vitro</i>	Blocks ZIKV replication in U2OS cells	Targets AXI receptors and blocks clathrin-mediated endocytosis	(Rausch et al., 2017)
Suramin	<i>In vitro</i>	Inhibits viral attachment and the release of infectious progeny in Vero cells	Inhibits viral replication by preventing viral adsorption, entry and replication.	(Abulescu et al., 2017; Tan et al., 2017)
ZINC33683341 and ZINC49605556	<i>In silico</i> / <i>In vitro</i>	Inhibits viral replication in Vero cells	Inhibits the function of protein E by binding the viral receptors	(Sandun et al., 2016)
25-hydroxycholesterol	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Inhibits viral infection <i>in vitro</i> (A549, BHK-21, HeLa and Vero cells), reduces the morbidity and mortality in mice and considerably reduces fever and viremia in monkeys	Inhibits viral entry possibly blocking viral internalization	(Li et al., 2017a)

7. Conclusions

Current studies suggest that ZIKV produces an ensemble of structurally different virions circulating in an organism, collectively contributing to virus dissemination and tissue tropism. Considering that apoptotic mimicry may be used by ZIKV as an entry mechanism and that prM has also showed to be able to mediate this process, the release of immature particles may be advantageous for the virus, as it would increase the range of ZIKV susceptible cells. Thus, the degree of viral particle maturation and the amount of prM, E and PS exposed on the surface of the virus seem to be determinant in ZIKV entry mechanism in cells and appear to safeguard viral evolutionary processes of infectivity. Further studies regarding the role of viral particle maturation, the tropism and the cellular receptors involved in ZIKV entry are needed.

Acknowledgements

This study was financed by the National Council for the Improvement of Higher Education – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, National Council for Scientific and Technological Development - Brazil (CNPq) and the Department of Science and Technology of the Ministry of Health - Brazil (Decit/SCTIE/MS).

Declarations of interest

None.

References

- Aagaard, K.M., Lahon, A., Suter, M.A., Arya, R.P., Seferovic, M.D., Vogt, M.B., Hu, M., Stossi, F., Mancini, M.A., Harris, R.A., Kahr, M., Eppes, C., Rac, M., Belfort, M.A., Park, C.S., Lacerazza, D., Rico-hesse, R., 2017. Primary human placental trophoblasts are permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Nat. Publ. Group* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep41389>.
- Adams, S.C., Broom, A.K., Samuels, L.M., Hartnett, A.C., Howard, M.J., Coelen, R.J., Mackenzie, J.S., Hall, R.A., 1995. Glycosylation and antigenic variation among kunjin virus isolates. *Virology* 206, 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80018-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80018-2).
- Alam, A., Imam, N., Farooqui, A., Ali, S., Malik, M.Z., Ishrat, R., 2017. Recent trends in ZIKV research: a step away from cure. *Biomed. Pharmacother.* 91, 1152–1159. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.045>.
- Albulescu, I.C., Kovacicova, K., Tas, A., Snijder, E.J., Van Hemert, M.J., 2017. Suramin inhibits ZIKA virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antivir. Res.* 143, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.04.016>.
- Alen, M.M.F., Kaptein, S.J.F., De Burghgraeve, T., Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., 2009. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. *Virology* 387, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.043>.
- Amara, A., Mercer, J., 2015. Viral apoptotic mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 461–469. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3469>.
- Barkhash, A.V., Perelygin, A.A., Babenko, V.N., Brinton, M.A., Voevoda, M.I., 2012. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. *Antivir. Res.* 93, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.10.017>.
- Beasley, D.W.C., Davis, C.T., Estrada-Franco, J., Navarro-Lopez, R., Campomanes-Cortes, A., Tesh, R.B., Weaver, S.C., Barrett, A.D.T., 2004. Genome sequence and attenuating mutations in west nile virus isolate from Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2221–2224. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040647>.
- Brazil Ministry of Health, 2018. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus ZIKA e outras etiologias infecciosas, até a semana epidemiológica 40 de 2018.
- Cambi, A., Koopman, M., Figdor, C.G., 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell. Microbiol.* 7, 481–488. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00506.x>.
- Cao, B., Parnell, L.A., Diamond, M.S., Mysorekar, I.U., 2017. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of ZIKA virus in pregnant mice. *J. Exp. Med.* 214, 2303.
- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., Sall, A.A., Musso, D., 2014. ZIKA virus, french polynesia, south pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1960. <https://doi.org/10.3201/eid2011.141380>.
- Carneiro, B.M., Batista, M.N., Cláudia, A., Braga, S., Nogueira, M.L., Rahal, P., 2016. The green tea molecule EGCG inhibits ZIKA virus entry. *Virology* 496, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.012>.
- Chen, S.T., Lin, Y.L., Huang, M.T., Wu, M.F., Cheng, S.C., Lei, H.Y., Lee, C.K., Chiou, T.W., Wong, C.H., Hsieh, S.L., 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 453, 672–676. <https://doi.org/10.1038/nature07013>.
- Chen, S., Liu, R., Wu, M., Lin, Y., Chen, S., Tan, D.T., 2012. CLEC5A Regulates japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality. *PLoS Pathog.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002655>.

- Chen, J.C., Wang, Z., Huang, H., Weitz, S.H., Wang, A., Qiu, X., Baumeister, M.A., Uzgiris, A., Matias, M., Wang, Z., Rodriguez, J., Cruz, S., 2016. Infection of human uterine fibroblasts by ZIKA virus in vitro: implications for viral transmission in women. *Int. J. Infect. Dis.* 51, 139–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.015>.
- Chu, J.J.H., Ng, M.L., 2004. Infectious entry of west nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway infectious entry of west nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* 78, 10543–10555. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10543>.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T.M., Higa, L.M., Castanho, M.A.R.B., Da Poian, A.T., 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>.
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.Q., Musyoki, A.M., Cheng, H., Zhang, Y., Yuan, Y., Song, H., Haywood, J., Xiao, H., Yan, J., Shi, Y., Qin, C.F., Qi, J., Gao, G.F., 2016. Structures of the ZIKA virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe* 19, 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>.
- Dang, J., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V.S., Eroshkin, A.M., Rana, T.M., 2016. ZIKA virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Stem Cells* 19, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>.
- Davis, C.W., Mattel, L.M., Nguyen, H., Ansarah-sobrinho, C., Doms, R.W., Pierson, T.C., 2006a. The location of asparagine-linked glycans on west nile virions controls their interactions with CD209 (Dendritic Cell-specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin) *. *J. Biol. Chem.* 281, 37183–37194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605429200>.
- Davis, C.W., Nguyen, H., Hanna, S.L., Sa, M.D., Doms, R.W., Pierson, T.C., 2006b. West nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J. Virol.* 80, 1290–1301. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1290>.
- Dejnirattai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.M., Malasit, P., Rey, F.A., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., 2016. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with ZIKA virus. *Nat. Immunol.* 17, 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>.
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., Haddow, A.J., 1952. ZIKA virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520.
- Dikhit, M., Ansari, Y., Trivedi, K., Mansuri, R., Sahoo, B.R., Dehury, B., Amit, A., Roshan, K., Sahoo, G.C., Ali, V., Bimal, S., Das, P., 2016. Computational prediction and analysis of potential antigenic CTL epitopes in ZIKA virus: a first step towards vaccine development. *Infect. Genet. Evol.* 45, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.037>.
- Dowd, K.A., Mukherjee, S., Kuhn, R.J., Pierson, C., 2014. Combined effects of the structural heterogeneity and dynamics of flaviviruses on antibody recognition. *J. Virol.* 88, 11726–11737. <https://doi.org/10.1128/JVI.01140-14>.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. ZIKA virus outbreak on yap island, federated states of micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>.
- ECDC, E.C. for D.P. and C., 2015. Rapid Risk Assessment: ZIKA Virus Epidemic in the Americas: Potential Association with Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome, 10 December 2015. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- Fairn, G.D., Schieber, N.L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R.L., Grinstein, S., Parton, R.G., 2011. High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylinositol. *J. Cell Biol.* 194, 257–275. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012028>.
- Fink, S.L., Vojtech, L., Wagoner, J., Slivinski, N.S.J., Jackson, K.J., Wang, R., Khadka, S., Luthra, P., Basler, C.F., Polyak, S.J., 2018. The antiviral drug arbidol inhibits ZIKA virus. *Sci. Rep.* 8, 8989. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27224-4>.
- Fontes-garfias, C.R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A.E., Medeiros, B.A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C.M., Rossi, S.L., Wang, T., Weaver, S.C., 2017. Functional analysis of glycosylation of ZIKA virus envelope protein. *Cell Rep.* 21, 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016>.
- Göertz, G.P., Abbo, S.R., Fros, J.J., Pijlman, G.P., 2017. Functional RNA during ZIKA virus infection. *Virus Res.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S.M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D.J., Gorman, M.J., Richner, J.M., Caine, E.A., Salazar, V., Moley, K.H., Diamond, M.S., 2016. ZIKA virus infection damages the testes in mice. *Nature* 540, 438–442.
- Hacker, K., White, L., de Silva, A.M., 2009. N-linked glycans on dengue viruses grown in mammalian and insect cells. *J. Gen. Virol.* 90, 2097–2106. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012120-0>.
- Hackett, B.A., Cherry, S., 2018. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720032115>.
- Hafizi, S., Dahlback, B., 2006. Gas6 and protein S Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J.* 273, 5231–5244. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05529.x>.
- Hamel, R., DeJarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-lecoini, M., Surasombatpattana, P., Taligani, L., Thomas, F., Cao-lormeau, V., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., 2015. Biology of ZIKA virus infection in human skin cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>.
- Hasan, S.S., Miller, A., Sappapapu, G., Fernandez, E., Klose, T., Long, F., Fokine, A., Porta, J.C., Jiang, W., Diamond Jr., M.S., C. J.E., Kuhn, R.J., Rossman, M.G., 2017. A human antibody against ZIKA virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nat. Commun.* 8, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms14722>.
- Haslwanter, D., Blas, D., Heinz, F.X., Stiasny, K., 2017. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS Pathog.* 13, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006643>.
- Hastings, A.K., Yockey, L.J., Jagger, B.W., Fikrig, E., Diamond, M.S., Iwasaki, A., Hastings, A.K., Yockey, L.J., Jagger, B.W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H.F., 2017. TAM receptors are not required for ZIKA virus infection in mice article TAM receptors are not required for ZIKA virus infection in mice. *Cell Rep.* 19, 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.058>.
- Heinz, F.X., Stiasny, K., 2012. Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* 55, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.024>.
- Heinz, F.X., Stiasny, K., 2017. The antigenic structure of zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. *Mol. Biol. Rev.* 81, 16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>. (e00055).
- Hilgard, P., Stockert, R., 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069–1077. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.18713>.
- Hoving, J.C., Wilson, G.J., Brown, G.D., Town, C., Africa, S., 2014. Microreview signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. 16, 185–194. <https://doi.org/10.1111/cmi.12249>.
- Junhon, J., Lausumpao, M., Supasa, S., Noisakran, S., Songlaeng, A., Saraithong, P., Chaichoun, K., Utaipat, U., Keelapang, P., Kanjanahaluethai, A., Puttikhant, C., Kasinrerk, W., Malasit, P., Sittisombut, N., 2008. Differential modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution, and virus infectivity by conserved residues at nonfurin consensus positions of the dengue virus pr-M junction. *J. Virol.* 82, 10776–10791. <https://doi.org/10.1128/JVI.01180-08>.
- Kaksonen, M., Roux, A., 2018. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Publ. Group* 19. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>.
- Kaufmann, B., Rossmann, M.G., 2012. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.005>.
- Kay, J.G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., Grinstein, S., Gruenberg, J.E., 2012. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol. Biol. Cell* 23, 2198–2212. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0936>.
- Kell, A.M., Gale Jr., M., 2015. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.001>.
- Khoo, U.S., Chan, K.Y.K., Chan, V.S.F., Lin, C.L.S., 2008. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNS for infection. *J. Mol. Med.* 86, 861–874. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0350-2>.
- Kim, S.Y., Li, B., Linhardt, R.J., 2017a. Pathogenesis and inhibition of flaviviruses from a carbohydrate perspective. *Pharmaceuticals* 10, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ph10020044>.
- Kim, S.Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J.S., Linhardt, R.J., 2017b. Interaction of ZIKA virus envelope protein with glycosaminoglycans. *Biochemistry* 56, 1151–1162. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01056>.
- Kostyuchenko, V.A., Lim, E.X., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T., Ooi, J.S.G., Shi, J., Lok, S., Nile, W., Nile, W., Polynesia, F., Fig, E.D., Zikv, T., Fig, E.D., 2016. Structure of the thermally stable ZIKA virus. *Nature* 533, 425–428. <https://doi.org/10.1038/nature17994>.
- Kroschewski, H., Allison, S.L., Heinz, F.X., Mandl, C.W., 2003. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 308, 92–100. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00097-1).
- Kuhn, R.J., Dowd, K.A., Beth Post, C., Pierson, T.C., 2015. Shake, rattle, and roll: impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host. *Virology* 479–480, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2015.03.025>.
- Lee, E., Hall, R.A., Lobigs, M., Al, L.E.E.E.T., Irol, J.V., 2004. Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese Encephalitis and West Nile Viruses. *J. Virol.* 78, 8271–8280. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8271>.
- Lemke, G., Rothlin, C.V., 2010. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 327–336. <https://doi.org/10.1038/nri2303>.
- Lewis, J.K., Bothner, B., Smith, T.J., Siuzdak, G., 1998. Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6774–6778.
- Li, C., Deng, Y.-Q., Wang, S., Ma, F., Aliyari, R., Xing-Yao, H., Zhang, N.-N., Watanabe, M., Dong, H.-L., Liu, P., Li, X., Ye, Q., Tian, M., Hong, S., Fan, J., Zhao, H., Li, L., Vishlaghi, N., Buth, J.E., Au, C., Liu, Y., Lu, N., Du, P., Qin, F.X.-F., Zhang, B., Gong, D., Dai, X., Sun, R., Novitch, B.G., Xu, Z., Qin, C.-F., Cheng, G., 2017a. 25-hydroxycholesterol protects host against ZIKA virus infection and its associated microcephaly in a mouse model. *Immunity* 46, 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.012>.
- Li, C., Zhu, X., Ji, X., Quanquin, N., Deng, Y., Tian, M., Aliyari, R., Zuo, X., Yuan, L., Khan, S., Li, X., Jung, J.U., Nielsen-saines, K., Qin, F.X., Qin, C., Xu, Z., Cheng, G., 2017b. Chloroquine, a FDA-approved drug, prevents ZIKA virus infection and its associated congenital microcephaly in mice. *EBioMedicine* 24, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.034>.
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S., Lee, S., Ge, J., Wang, S., Goldman, S.A., Zlokovic, B.V., Zhao, Z., Jung, J.U., 2016. ZIKA virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell* 19, 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>.
- Liu, S., Delalio, L.J., Isakson, B.E., Wang, T.T., 2016. Brief ultrarapid communication AXI-mediated productive infection of human endothelial cells by ZIKA virus. *Circ. Res.* 119, 1183–1189. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309866>.
- Lozach, P.Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.L., Rey, F.A., Desprès, P., Arenzana-Seisdedos, F., Amara, A., 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* 280, 23698–23708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504337200>.

- Martina, B.E.E., Koraka, P., Van Den Doel, P., Rimmelzwaan, G.F., Haagmans, B.L., Osterhaus, A.D.M.E., 2008. DC-SIGN enhances infection of cells with glycosylated west nile virus in vitro and virus replication in human dendritic cells induces production of IFN- α and TNF- α . *Virus Res.* 135, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.02.008>.
- Martinez-pomares, L., 2012. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1177–1186. <https://doi.org/10.1189/jlb.0512231>.
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Guivel-benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., Amara, A., 2012. The TIM and TAM families of phosphatidylinositol receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* 12, 544–557. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejmanc, O., Gressens, P., Schwartz, O., Amara, A., Meertens, L., Labeau, A., Dejmanc, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Schwartz, O., Amara, A., 2017. Axl Mediates ZIKA virus entry in Human glial cells and modulates innate immune responses report Axl Mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep.* 18, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>.
- Mercer, J., Helenius, A., 2010. Apoptotic mimicry: phosphatidylinositol-mediated macropinosytosis of vaccinia virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1209, 49–55. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05772.x>.
- Mercer, J., Schelhaas, M., Helenius, A., 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 803–833. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>.
- Miller, J.L., deWet, B.J.M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Gordon, S., 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 4, e17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040017>.
- Miner, J.J., Diamond, M.S., 2017. Review ZIKA virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* 21, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>.
- Mounce, B.C., Cesaro, T., Carrau, L., Vallet, T., Vignuzzi, M., 2017. Curcumin inhibits ZIKA and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antivir. Res.* 142, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.014>.
- Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T., Kjekshus, R., 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 16, 1–16. <https://doi.org/10.1042/bj20031000>.
- Munjal, A., Khandia, R., Dhama, K., Sachan, S., Karthik, K., Ruchi, T., Malik, Y.S., Kumar, D., Singh, R.K., Iqbal, H.M.N., Joshi, S.K., 2017. Advances in developing therapies to combat ZIKA virus: current knowledge and future perspectives. *Front. Microbiol.* 8, 1469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01469>.
- Musso, D., Roche, C., Nhan, T.X., Robin, E., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M., 2015. Detection of ZIKA virus in saliva. *J. Clin. Virol.* 68, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Desprès, P., 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4, 723–728. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor866>.
- Pagani, I., Ghezzi, S., Ulisse, A., Rubio, A., Turrini, F., Garavaglia, E., Candiani, M., Castilletti, C., Ippolito, G., Poli, G., Broccoli, V., Panina-bordignon, P., Vicenzi, E., 2017. Human endometrial stromal cells are highly permissive to productive infection by ZIKA virus. *Nat. Publ. Group* 7. <https://doi.org/10.1038/srep44286>.
- Perera-Jecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., Amara, A., 2014. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses* 6, 69–88. <https://doi.org/10.3390/v6010069>.
- Persaud, M., Martinez-lopez, A., Bu, C., Porcelli, S.A., Diaz-grí, F., 2018. Infection by ZIKA viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Viruses* 10, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.virus.2018.03.009>.
- Pierson, T.C., Diamond, M.S., 2013. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* 2, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.011>.
- Quicke, K.M., Bowen, J.R., Johnson, E.L., Schinazi, R.F., Chakraborty, R., Suthar, M.S., Quicke, K.M., Bowen, J.R., Johnson, E.L., McDonald, C.E., Ma, H., Neal, J.T.O., 2016. ZIKA virus infects human placental macrophages. *Cell Host Microbe* 20, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>.
- Rausch, K., Hackett, B.A., Weinbren, N.L., Schultz, D.C., Coyne, C.B., Cherry, S., Rausch, K., Hackett, B.A., Weinbren, N.L., Reeder, S.M., Sadovsky, Y., 2017. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against ZIKA virus. *Cell Rep.* 18, 804–815. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.068>.
- Retallack, H., Di, E., Arias, C., Knopp, K.A., Laurie, M.T., 2016. ZIKA virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 14408–14413. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618029113>.
- Rey, A., Stiasny, K., Heinz, F.X., 2017. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Curr. Opin. Virol.* 24, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.009>.
- Sandun, F., Teshan, F., Stefanik, M., Eyer, L., Ruzek, D., 2016. An approach for ZIKA virus inhibition using homology structure of the envelope protein. *Mol. Biotechnol.* 58, 801–806. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9979-1>.
- Schuler-faccini, L., Ribeiro, E.M., Feitosa, I.M.L., Horovitz, D.D.G., Cavalcanti, D.P., 2016. Possível associação entre a infecção pelo vírus ZIKA E a microcefalia — Brasil, 2015. In: *Cent. Dis. Control Prev. - Morb. Mortal. Wkly Rep.* 65, pp. 1–4.
- Shi, Y., Gao, G.F., 2017. Structural biology of the ZIKA virus. *Trends Biochem. Sci.* 42, 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>.
- Shimajima, M., Takenouchi, A., Shimoda, H., Kimura, N., Maeda, K., 2014. Distinct usage of three C-type lectins by Japanese encephalitis virus: DC-SIGN, DC-SIGNR, and LSECtin. *Arch. Virol.* 159, 2023–2031. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2042-2>.
- Shiryaev, S.A., Mesci, P., Pinto, A., Fernandes, I., Sheets, N., Shrestha, S., Farhy, C., Huang, C.-T., Strongin, A.Y., Muotri, A.R., Terskikh, A.V., 2017. Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for ZIKA virus treatment and prophylaxis. *Sci. Rep.* 7, 15771. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15467-6>.
- Simpson, D.H., 1964. ZIKA virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58, 335–338. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(64\)90200-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(64)90200-7).
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T.C., Rossmann, M.G., Kuhn, R.J., 2016. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of ZIKA virus. *Science* 352 (80), 467–470. <https://doi.org/10.1126/science.1253166>.
- Smit, J.M., Moesk, B., Rodenhuis-zibert, I., Wilschut, J., 2011. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Virus* 3, 160–171. <https://doi.org/10.3390/v3020160>.
- Su, C.M., Liao, C.L., Lee, Y.L., Lin, Y.L., 2001. Highly sulfated forms of heparin sulfate are involved in Japanese encephalitis virus infection. *Virology* 286, 206–215. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0986>.
- Tabata, T., Pettit, M., Puerta-guardo, H., Fang-hoover, J., Harris, E., Tabata, T., Pettit, M., Puerta-guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-hoover, J., 2016. ZIKA virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe* 20, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.002>.
- Tan, C.W., Sam, I.-C., Chong, W.L., Lee, V.S., Chan, Y.F., 2017. Polysulfonate suramin inhibits ZIKA virus infection. *Antivir. Res.* 143, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.04.017>.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., Christian, K.M., Didier, R.A., Jin, P., Song, H., Ming, G., 2016. ZIKA virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth brief report zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Stem Cells* 18, 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>.
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Bix, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829. <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>.
- Thepparit, C., Phoolcharoen, W., Suksanpaisan, L., Smith, D.R., 2004. Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology* 73170, 78–86. <https://doi.org/10.1159/000077830>.
- Wang, L., Chen, R.F., Liu, J.W., Lee, I.K., Lee, C.P., Kuo, H.C., Huang, S.K., Yang, K.D., 2011. DC-SIGN (CD209) promoter –336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000934>.
- Wang, P., Hu, K., Luo, S., Zhang, M., Deng, X., Li, C., Jin, W., Hu, B., He, S., Li, M., Du, T., Xiao, G., Zhang, B., Liu, Y., Hu, Q., 2016. DC-SIGN as an attachment factor mediates Japanese encephalitis virus infection of human dendritic cells via interaction with a single high-mannose residue of viral E glycoprotein. *Virology* 488, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.virus.2015.11.006>.
- Wang, A., Thurmond, S., Islas, L., Hui, K., Hai, R., 2017a. ZIKA virus genome biology and molecular pathogenesis. *Nat. Publ. Group* 13, 1–6. <https://doi.org/10.1038/eml.2016.141>.
- Wang, Z., Wang, Z., Zhen, Z., Feng, K., Guo, J., Gao, N., Fan, D., Han, D., Barr, G., 2017b. Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *J. Gen. Virol.* 98, 2061–2068. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000886>.
- Wells, M.F., Salick, M.R., Wiskow, O., Ye, C., Kaykas, A., Eggan, K., Wells, M.F., Salick, M.R., Wiskow, O., Ho, D.J., Worringer, K.A., Ihry, R.J., 2016. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection brief report genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from ZIKA virus infection. *Stem Cells* 19, 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.011>.
- Ye, Q., Liu, Z.Y., Han, J.F., Jiang, T., Li, X.F., Qin, C.F., 2016. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* 43, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.004>.
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., Chen, J., 2014. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* (80-) 319, 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>.
- Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., Ji, X., Xu, Y.-P., Li, G., Li, C., Wang, H.-J., Deng, Y.-Q., Wu, M., Cheng, M.-L., Ye, Q., Xie, D.-Y., Li, X.-F., Wang, X., Shi, W., Hu, B., Shi, P.-Y., Xu, Z., Qin, C.-F., 2017. A single mutation in the prM protein of ZIKA virus contributes to fetal microcephaly. *Science* 88 (80), 11726–11737. <https://doi.org/10.1126/JVI.01140-14>.
- Zelensky, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>.
- Zhang, Y., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2007. Structure of immature west nile virus. *J. Virol.* 81, 6141–6145. <https://doi.org/10.1128/JVI.00037-07>.
- Zhang, Z., Li, Z., Yuan, S., 2017. The role of secretory autophagy in zika virus transfer through the placental barrier. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 206. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00206>.

APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES

Artigo 3



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication

Rossella Gratton ^{1,*}, Almerinda Agrelli ², Paola Maura Tricarico ¹, Lucas Brandão ³ and Sergio Crovella ^{1,4}

¹ Department of Advanced Diagnostics, IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34137 Trieste, Italy; tricaricopa@gmail.com

² Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235—Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil; almerindaapimentel@gmail.com

³ Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235—Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil; dpatologia@ufpe.br

⁴ Department of Medical Surgical and Health Sciences, University of Trieste, Strada di Fiume 447, 34149 Trieste, Italy; sergio.crovella@burlo.trieste.it

* Correspondence: rossella.gratton@gmail.com; Tel.: +39-040-3785422

Received: 31 January 2019; Accepted: 23 February 2019; Published: 28 February 2019



Abstract: Zika virus (ZIKV) still constitutes a public health concern, however, no vaccines or therapies are currently approved for treatment. A fundamental process involved in ZIKV infection is autophagy, a cellular catabolic pathway delivering cytoplasmic cargo to the lysosome for degradation—considered as a primordial form of innate immunity against invading microorganisms. ZIKV is thought to inhibit the Akt-mTOR signaling pathway, which causes aberrant activation of autophagy promoting viral replication and propagation. It is therefore appealing to study the role of autophagic molecular effectors during viral infection to identify potential targets for anti-ZIKV therapeutic intervention.

Keywords: Zika virus; autophagy; Akt-mTOR; innate immunity; therapeutic targets

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus), member of the *Flaviviridae* family, first isolated in 1947 from a febrile rhesus macaque monkey in the Zika Forest (Uganda). Symptomatic ZIKV infections have always been limited to small clusters of patients and to sporadic cases causing localized outbreaks throughout Africa, Asia, and Oceania. Nevertheless, this emerging arbovirus infection reached a global scale of diffusion since its arrival in the Americas in 2015, particularly devastating in the northeastern territories of Brazil. This virus was declared a public health emergency after reports of clinical complications such as neonatal microcephaly and other neurological disorders following infection [1,2]. Even if viral circulation is currently at low levels in endemic areas, presumably due to the development of herd immunity, Zika is still considered an ongoing challenge requiring strict surveillance [3]. Epidemiological data from Brazilian territories in 2018 provide support to the notion that the impact of ZIKV infection on health is diminishing. Indeed, the Brazilian Ministry of Health asserted that of the 16,735 suspected changes in the growth and development of children exposed to ZIKV infection, 3,267 (19.5%) were confirmed cases [4]. In spite many efforts over the last years aimed at developing preventive vaccines and strategies for limiting the effects of ZIKV infection, few results have been obtained so far. Therefore, a characterization of ZIKV biology is required in order to identify potential targets for effective therapeutic interventions [3].

ZIKV, a 50 nm enveloped and icosahedral particle with an 11 kb positive-strand RNA genome, is typically transmitted by bites from infected *Aedes* genus mosquitoes, in addition to mother-to-child

transmission, blood transfusion, sexual contact, and organ transplantation [2]. ZIKV's viral RNA genome encodes three structural proteins (membrane precursor prM, envelope E glycoprotein, and core C) and seven non-structural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5), which have been found to play a pivotal role in assisting viral pathogenesis and propagation by mediating viral entry and promoting viral translation and replication [5,6]. Viral structural glycoproteins, in particular envelope E glycoprotein, mediate binding to cellular receptors, thereby triggering endocytotic pathways. These interactions between cellular receptors and glycoproteins allow ZIKV to infect specific cellular types including fibroblasts, immature dendritic cells, epidermal keratinocytes, and stem-cell-derived human neural progenitor cells [7]. The uptake of viral particles occurs primarily through clathrin-dependent endocytosis. Surface glycoproteins of internalized viral particles undergo conformational changes due to the endosomal lumen's acidic environment, which promote viral envelope fusion with the endosomal membrane. This completes the entry process, which implies the delivery of viral RNA into the cytoplasm of the host cell. The positive-sense RNA is translated into a polyprotein, which is subsequently cleaved to release structural and NS proteins [7]. Cellular compartments such as the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus, seem to be crucial for viral replication and propagation. First, ER membranes give rise to the vesicles involved in autophagic flux, a cellular mechanism exploited and manipulated by *Flaviviruses* in order to enhance their own replication and initiate infection [8]. Second, immature viral particles are assembled within the ER and virions traffic through the Golgi network for particle maturation prior to the release from the infected cell. Mature particles are then delivered into the extracellular environment where they are ready to commence a new infectious life cycle (Figure 1) [7,9].

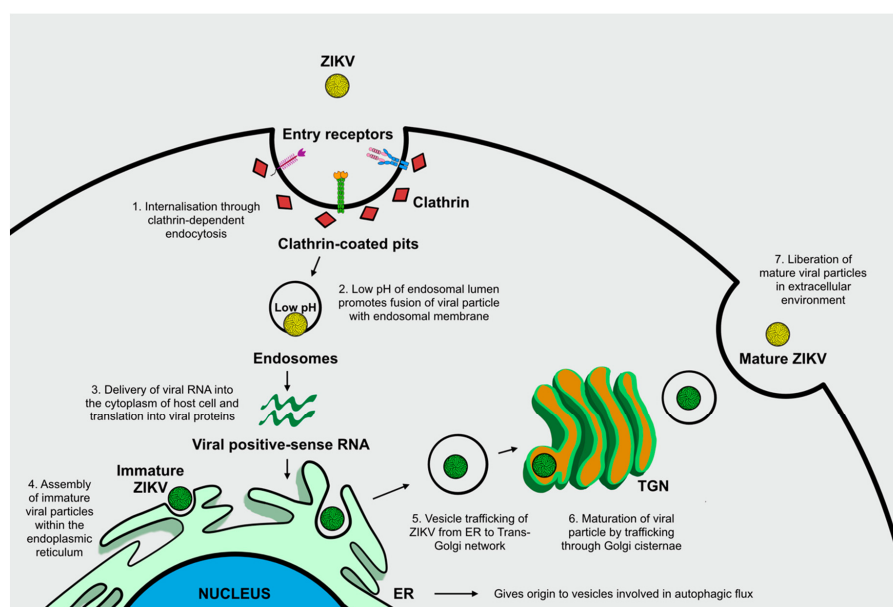


Figure 1. Mechanisms involved in Zika virus-host cell interactions. The binding of ZIKV structural glycoproteins to cellular entry receptors triggers viral internalization through clathrin-dependent endocytosis (1). The endosomal lumen's acidic pH induces conformational changes of viral surface glycoproteins thus allowing the fusion of viral envelope with endosomal membrane, causing the release of viral RNA into the cytosol (2). Viral RNA is then translated into viral proteins (3). Immature

viral particles assemble within the endoplasmic reticulum (ER) (4), and vesicle trafficking enables the transition of ZIKV from the ER to the Golgi network (5). ZIKV then passes through the cisternae of the Golgi apparatus and promotes viral maturation (6). Mature ZIKV particles are delivered and liberated into the extracellular environment (7).

The goal of this review is to investigate in depth the role of autophagy during ZIKV infection. The precise molecular mechanisms involved in ZIKV-induced autophagy have not been fully elucidated. Nevertheless, previous findings strongly suggest that a greater insight and description of the effectors participating in these cellular processes might be required for highlighting potential molecules to be used as possible therapeutic targets, and to design compounds able to modulate the activity of autophagy in ZIKV-infected cells [8,10].

2. Autophagy

Autophagy is a strictly regulated cellular degradative pathway involving the delivery of cytoplasmic cargoes for lysosomal degradation and subsequent recycling of the resulting macromolecular constituents. Currently three forms of autophagy have been identified and well characterized—microautophagy, chaperone-mediated autophagy, and macroautophagy—that differ in their type of exploited physiological function and mode of cargo delivery to lysosomes [11]. In this review, we focus on macroautophagy (herein referred to as autophagy), a mechanism by which cell substrates are included in double-membrane vesicles termed autophagosomes [12]. Eukaryotic cells benefit from autophagy, which is the process involved in removing damaged or long-living organelles and redundant proteins (including peroxisomes, mitochondria, and ER) through lysosome machinery. Indeed, this cellular process is known to occur virtually at basal levels in every living cell in the organism, but it can be rapidly upregulated to respond to unfavorable stress signals by generating energy for cellular homeostasis maintenance [11].

The initial steps include phagophore or pre-autophagosome formation, an isolation membrane able to enclose and fuse its edges forming an autophagosome, which is a double-membrane partition that includes cytoplasmic material. Autophagosomes then fuse with lysosomes forming autolysosome or degradative autophagosomes, compartments where sequestered intra-autophagosomal components are degraded by lysosomal hydroxylases [11].

Several factors and regulatory kinases can mediate the activation and progression of this process. The main regulatory molecules are called autophagy-related proteins (Atgs), the majority of which are highly conserved from yeast to humans with many yeast orthologs found in mammalian cells.

1A/1B light-chain 3 (LC3) is an Atg protein that plays a central role in autophagy. During the engulfment of cytosolic components by the autophagosomes, a soluble and cytosolic form of LC3 (LC3-I) is lipidated in conjugation with phosphatidylethanolamine into an active moiety of LC3 (LC3-II). This form goes to autophagosomal membranes promoting membrane elongation. Following fusion of autophagosomes and lysosomes, LC3-II is still retained in the membrane and is itself degraded with autophagosomal components by lysosome hydroxylases. Therefore, in the presence of stimuli cable of enhancing autophagic responses, there is an increment in LC3 cellular levels while a correct completion of the process is characterized by its reduction [13,14].

LC3-II interacts with a class of autophagy adaptors known as sequestosome-1/p62-like receptors (SLRs), which are pathogen recognition receptors (PRRs) cable of selectively targeting diverse microorganisms towards selective autophagic degradation. Typically, SLRs contain three principal domains: cargo recognition and capture domains such as ubiquitin-associate (UBA) domain allowing a strong and selective binding to ubiquitin chains; LC3-interacting region (LIR), through which SLRs recognize multiple sites of autophagosome-localized LC3; and additional protein interaction domains involved in inflammatory processes. In response to bacterial and viral infections the main SLRs are given by sequestosome-1/p62 (p62), autophagy cargo receptor (NBR1), and calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2 (CALCOCO2). These proteins may lead to selective autophagy mainly via ubiquitin-signaling of invasive microorganisms. SLRs are able to pack ubiquitinated

microbial components via the UBA site, while the interaction with LC3 through the LIR region promotes the delivery of packed substrates towards the autophagic route. Therefore, SLRs constitutes a molecular bridge between LC3 and ubiquitinated cargoes, thereby promoting the enclosure and degradation into autophagosomes of target molecules [15,16].

2.1. Autophagy and Its Role in the Immune Responses Against Invading Microorganisms

A strongly emergent concept correlates autophagy with immune functions. This cellular process can be considered a primordial form of innate immunity counteracting invading microorganisms. In mammalian cells these primordial functions of autophagy have evolved, and are now integrated in several innate and adaptive pathways. Indeed, autophagy has been seen to mediate multiple aspects of the immune response including direct elimination of intracellular pathogens comprising viruses, the control of adaptive responses through the promotion of antigen presentation, and the control of inflammation and inflammasome activation with subsequent cytokine secretion [17].

During viral infections, innate immunity disposes of several defense mechanisms that can rapidly detect the presence of invading microorganisms, and are promptly solicited to counteract invasion by mounting an efficient antiviral first-line response. The principle defense mechanism is given via the recognition of viral-conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by cytosolic or membrane-bound PRRs. This is followed by the transduction of intracellular signals culminating in the stimulation of innate immune responses, principally including the activation of transcription factors that regulate the synthesis of inflammatory cytokines. During the progressive mounting of this innate response, autophagy constitutes an integrated, valid, and immediate option by exerting a direct immune function. Indeed, autophagy is a constantly ongoing cellular process that traps pathogens and mediates their prompt degradation following infection by capturing intracellular pathogens into autophagosomes (Figure 2) [17,18].

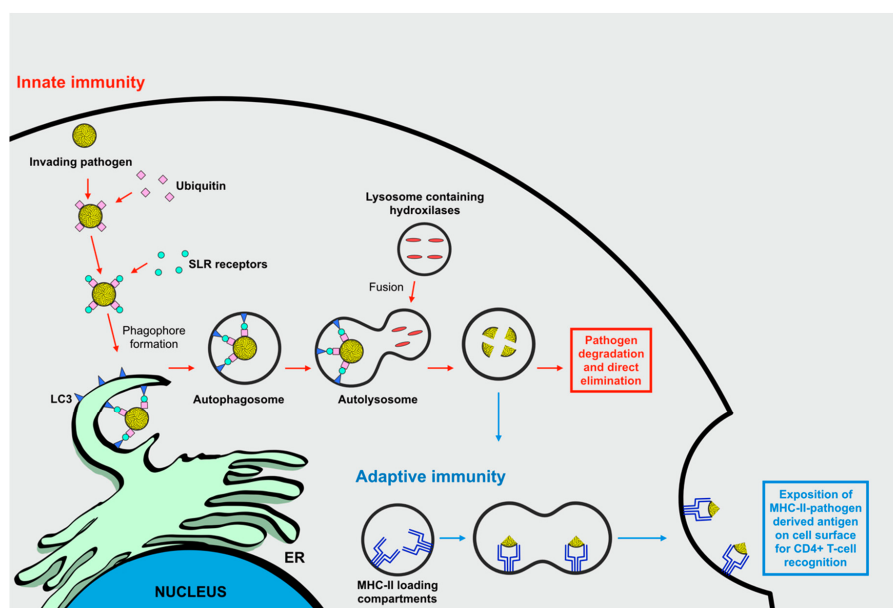


Figure 2. The role of autophagy during innate and adaptive immune responses against invading microorganisms. As a fundamental component of the innate immune response, selective autophagy degrades invading pathogens principally through ubiquitin-signaling. Ubiquitinated pathogens are

recognized by sequestosome-1/p62-like receptors (SLRs), which are involved in creating a molecular bridge between 1A/1B light-chain 3 (LC3) recruited on ER membranes and the ubiquitinated microbial components, thus promoting their enclosure into the autophagosomes of target molecules. The subsequent fusion of autophagosomes with lysosomes leads to pathogen degradation and direct elimination. These vesicles containing exogenous antigenic peptides, derived from lysosome degradation, fuse with major histocompatibility complex class II (MHC-II) loading-compartments. After loading on MHC-II, the peptides are transported to the cell surface in order to induce the stimulation of a CD4⁺ T-cell anti-viral adaptive immune response.

Nevertheless, autophagic machinery activation is not limited to the progression of innate immune responses, it also performs a crucial role in the context of adaptive immunity during viral infections by influencing cytosolic antigen processing and presentation for major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules. MHC-II molecules present exogenous antigenic peptides derived from lysosome degradation. After loading on MHC-II, the peptides are transported to the cell surface in order to induce a CD4⁺ T-cell response (Figure 2) [16]. Interestingly, autophagosomes can deliver pathogen-derived antigens to MHC-II loading compartments as demonstrated by morphological analysis that showed a 30%–50% co-staining between MHC-II compartments and the autophagosome marker LC3 [19].

In addition, a complex association has been found between autophagy and the regulation of inflammatory responses, affecting the secretion of inflammatory and anti-microbial mediators, and inflammasome activation. Inflammation constitutes a vital host response to tissue loss and cellular homeostasis, thus promoting host defense, tissue repair and remodeling, and metabolism regulation. During infection, a cascade of signals leads to the recruitment of inflammatory cells (neutrophils and macrophages), which phagocytose damaged cells and infectious agents, thus promoting the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines (e.g., tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 1 (IL-1)) for the subsequent activation of adaptive immune responses [17,18].

Different PRRs can recognize viral PAMPs, thus detecting the initiation of a viral infection. Following recognition, the activation of signaling pathways through different classes of PRRs (toll-like receptors (TLRs), nucleotide oligomerization domain-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs)), have been shown to converge with the autophagic route [17].

The principle PRRs involved in the recognition of viral PAMPs are TLRs, located on the plasma membrane (TLR1/2/4/5/6/10) for recognition of microbial membrane components or inside endosomal compartments (TLR 3/7/8/9) where uptaken microbial partitions are directed. Signal transduction is primarily mediated by toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) or myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88), for the activation of transcription factors including NF- κ B, IRF3/7, and API-1, which induce the expression of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-6 and IL-1 β) and type 1 interferons (INF), thus leading to the modulation of anti-viral immune responses [17,20–22]. TLR signaling pathways are thought to induce autophagy principally by promoting autophagosome formation, presumably in a Myd88 or TRIF-dependent manner [23]. Furthermore, autophagy is known to enhance viral recognition and modulate downstream synthesis of inflammatory cytokine production principally by delivering viral PAMPs to their receptors [24].

Another crucial connection between inflammatory responses and autophagy is related to the regulation of inflammasome activation [20]. Indeed, autophagy is known to regulate this activation by controlling the secretion levels of pro-inflammatory cytokines including IL-18 and IL-1 β , though the mechanisms underlining this regulatory activity are still under debate [20,25].

Nevertheless, autophagy might not only serve to sustain an inflammatory antiviral response, but also serve as an impediment on the magnitude of the host's antiviral reaction. Recently, some Atgs (namely Atg5 and Atg12) have been shown to down-regulate some PRRs, where autophagy might also serve as a brake on the pro-inflammatory response induced by the activation of NLRs

(Figure 3) [21,26–28]. Presumably, the role of autophagy in suppressing inflammatory responses is linked to the necessity to dampen immune signaling during viral infections to avoid excessive and potentially harming inflammatory responses. All this considered, while analyzing the interplay between inflammation and autophagy during viral infections, it is necessary to consider the possible dual function of the catabolic route: cooperation between autophagy and innate immunity, and the suppression of innate immunity by autophagy [21].

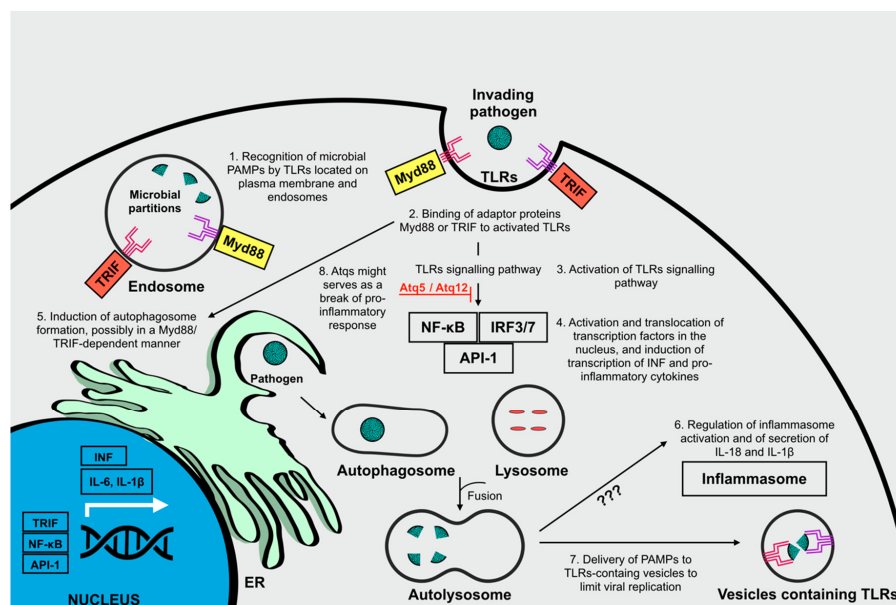


Figure 3. The role of autophagy in the regulation of inflammatory responses against invading pathogens. Microbial pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are recognized by toll-like receptors (TLRs) located on the plasma membrane or in endosomal compartments (1). The recognition of activated TLRs by adaptor proteins Myd88 or TRIF (2), activates TLR signaling pathways (3), involved in the activation of transcription factors NF-κB, IRF3/7, and API-1 that then translocate to the nucleus for the induction of INF and pro-inflammatory cytokines transcription (4). The promotion of autophagosome formation is induced in a Myd88- or TRIF-dependent manner (5), and leads to the regulation of inflammasome activation and secretion of pro-inflammatory cytokines, through mechanisms that remain not completely understood (6), and to the delivery of PAMPs to TLR-containing vesicles to limit viral replication (7). Besides promoting pro-inflammatory activities, autophagy also serves as an impediment on the magnitude of the host's antiviral reaction. Indeed, autophagy-related proteins (Atg12 and Atg5) might serve as a break for the pro-inflammatory response induce by TLRs (8).

2.2. Regulation of Autophagic Flux

Autophagy is sensitive to a great variety of stimuli that are transduced by different cellular effectors. In the presence of unfavorable stress conditions, the activation of autophagic flux assures energy supplies and molecular building blocks to sustain cellular proliferation and survival [29]. Specifically, the induction of autophagy is caused by many stress-inducing factors including starvation, growth-factor withdrawal, ER stress, redox stress, hypoxia, danger-associated molecular patterns, mitochondrial damage, chemicals, and irradiation [16,30]. Viruses can trigger many of these stresses in the host cell during different stages of their replication cycle. Viral binding to target receptors, as well

as viral intracellular replication, are the best described events during viral infection known to elicit stress responses and subsequent stimulation of autophagy [16].

However, all these signaling molecules transduce signals to a common target, the kinase mTOR, found to be directly upstream of the machinery involved in autophagosome formation. mTOR is a serine/threonine kinase considered a master regulator and gatekeeper of the autophagic pathway. In eukaryotic cells, mTOR forms two different signaling complexes: multiprotein complex 1 of mammalian target of rapamycin (mTORC1) and multiprotein complex 2 of mammalian target of rapamycin (mTORC2), composed of mTOR and multiple binding proteins. The two kinase complexes bind to diverse and distinct substrates and therefore promote the transduction of different downstream signaling pathways to modulate distinct cellular events [29,31].

Another aspect of autophagy subjected to severe regulation is the mobilization of membrane structures during the generation of autophagic compartments moving through the endo/exocytotic vesicular intracellular trafficking, which requires control by different GTPases [31].

Indeed, several small GTPases are indicated as crucial Atg proteins and they comprehend Rheb, Rabs, and RalB. Ras homology enriched in brain (Rheb) is known to activate, by direct and selective binding, mTORC1 [32]. Ras-related protein Rabs (Rabs) are involved in the regulation of autophagy intracellular vesicular trafficking including vesicle budding, delivery, tethering, and fusion [33]. Ras-related protein RalB (RalB) affects isolation of the pre-autophagosomal membrane and the maturation of autophagosomes by localizing on nascent autophagosomes following activation due to starvation and binding to Exo84 effector [34].

mTORC1 promotes anabolic cellular metabolism to supply the necessary building blocks for cell growth and proliferation. The activation of mTORC1 by nutrients and growth factors induces a blockade of autophagy at both a post-translation and transcriptional level through the phosphorylation of various Atgs involved in the promotion of autophagy initiation and autophagosome formation [29].

A well-known upstream regulator of mTORC1 is the PI3K/Akt pathway. Signaling route activation occurs at the cell membrane level following the binding of tyrosine kinase receptors (including epidermal growth factor receptor, insulin-like growth factor-1 receptor, G-protein-coupled receptors) to their ligands, causing stimulation of the PI3K/Akt signaling axis. Once activated, the PI3K catalyzes the phosphorylation of phosphoinositides to generate activated molecules—phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate and phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. The activated phosphoinositides bind and activate both the serine/threonine kinase Akt and the 3'-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). Next, PDK-1 phosphorylates Akt, which is then able to propagate its cellular signals to affect cell cycle progression, transcription, and apoptosis. In this context, Akt might trigger mTORC1 activation directly, catalyzing mTORC1 phosphorylation on S2448, or indirectly by phosphorylating and inactivating tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), normally exerting an inhibitory activity on mTORC1 when bound to Rheb [35]. Once activated, mTORC1 phosphorylates and inactivates multiple Atgs such as ULK1 and Atg13, two components of the ULK complex, in addition to AMBRA1 and Atg14L, constituent of the VPS34 complex, thus preventing autophagy initiation and transcription of lysosome and autophagy genes [29].

On the contrary, autophagy initiation induced by stress stimuli is characterized by the inactivation of mTORC1 until the complex is reactivated by energy supplies released as products of autolysosomal degradation at the end of autophagic flux [29].

3. Flavivirus Infection and Autophagy

As a fundamental part of the immune system, autophagy plays a crucial role in sensing the presence of viruses and mediating their elimination. It is thought that the consumption of intracellular nutrients caused by a competition between the invading virus and the host cells' metabolism constitutes one of the principal danger signals in the eukaryotic cell used to recognize infection and mount an appropriate antiviral immune response through the activation of autophagy [17]. Therefore, it is not

surprising that several viruses have evolved mechanisms to exploit and subvert autophagic machinery, directly or indirectly, to promote their replication and propagation [8].

Describing the role of autophagy in viral infection has been elucidating the puzzle relative to *Flavivirus* pathogenesis. Indeed, autophagy provides an adequate platform for *Flavivirus* replication during the early steps of infection, allowing apoptosis inhibition, innate immunity evasion, and lipid metabolism reordering to support robust replication [36].

Apart from exerting a degradative function through the recycling of damaged or long-living organelles, redundant proteins, or invading microbes via lysosomal machinery, autophagy has been also described to possess different biogenesis-associated functions [37]. This unconventional mechanism is known as secretory autophagy, involved in exporting a great variety of cytoplasmic substrates including cytokines, contents of intracellular organelles and invading microorganisms. The study of this process seems promising for a better characterization of *Flavivirus*–host cell interactions [37,38].

In fact, *Flaviviruses* can hijack the autophagic response in order to enhance their own replication and facilitate the establishment of infection [8]. Therefore, unraveling the role of autophagy during *Flavivirus* infection might have implications for better understanding viral pathogenesis and aid the identification of potential therapeutic targets.

Although the specific molecular mechanisms involved in the modulation of autophagy by *Flaviviruses* has yet to be fully understood, literature findings relative to Japanese encephalitis virus (JEV), Usutu virus (USUV), West Nile virus (WNV), Dengue virus (DENV), and Zika virus (ZIKV) are currently available.

Different studies suggest that JEV-induced autophagy exerts a crucial role in promoting viral replication. Indeed, the enhancement of viral progression following administration of autophagy inducers (e.g., rapamycin), and the suppression of viral growth after the administration of autophagy inhibitors (e.g., 3-methyladenine), create a strong correlation between JEV-induced alterations in the autophagy machinery and viral propagation [10,39]. JEV infection has been associated to an increment in LC3 lipidation levels and to its cytoplasmic aggregation, therefore leading to an upregulation of the autophagic pathway [10,36]. In addition, recent findings suggest that autophagic vesicles do not constitute a source of membrane compartments used by JEV to sustain its replication, but rather that viral-activated autophagy is capable of promoting the initial stages of infection, specifically the JEV entry process [36]. Moreover, the accumulation of autophagosomes is thought to enhance viral replication though the mechanisms underlining this process are not fully understood [39].

USUV belongs to the JEV serocomplex and has been recently, and rarely, detected in humans. Being closely related to JEV, the effects of USUV infection present a similar impact on autophagy when compared to JEV [40–42].

In the case of WNV, autophagy does not seem to play a pro-viral role, since this cellular process is supposedly not required for the activation and advancement of the viral life cycle [10]. Different experimental evidences support the presence of an upregulation of autophagy upon WNV infection, associated with an augmented lipidation and aggregation of LC3 [43,44]. Nevertheless, inhibition of autophagy by the depletion of essential autophagy Atg proteins, namely Atg5 and Atg7, is not associated to an alteration of WNV replication in infected cells therefore suggesting that a functional autophagy pathway is not required for WNV infectious particle production [10,45,46]. Taken together these findings indicate that the involvement of autophagy in WNV infection remains controversial, and further investigations are required to unravel the role of this pathway in WNV pathogenesis.

The re-emergence of DENV and ZIKV-infection indicated the necessity to characterise the principle mechanisms responsible for viral propagation in order to assess possible therapeutic interventions. In this context, autophagy appears to be a promising target. Indeed, substantial efforts to determine the major processes involved in the interaction between autophagy and viral infection are currently underway, which may result in interesting findings.

DENV is known to induce autophagy and this process possesses a pro-viral activity. First, the induction of autophagy in DENV-infected cells determines membrane reorganization to form autophagosomes that fuse with endosomes to form amphisomes. In this case, both autophagosomes and amphisomes are virus-induced double-membrane compartments in which DENV actively replicates. Second, it has been hypothesized that the upregulation of autophagy might suppress the host cells' unfolded protein response thus supporting DENV replication [8]. Finally, the induction of autophagy is crucial for targeting lipid droplets in order to stimulate lipid metabolism (lipophagy). Accumulating autophagosomes, generated following infection, preferentially associate to lipid droplets and promote the mobilization of lipid content, thus increasing lipid metabolism and β -oxidation to obtain free fatty acids and energy that are essential for sustaining viral replication [47,48]. Among the mentioned roles of autophagy in supporting DENV infection, the greatest impact of autophagy during DENV infection is associated to the promotion of lipid metabolism (Figure 4) [47].

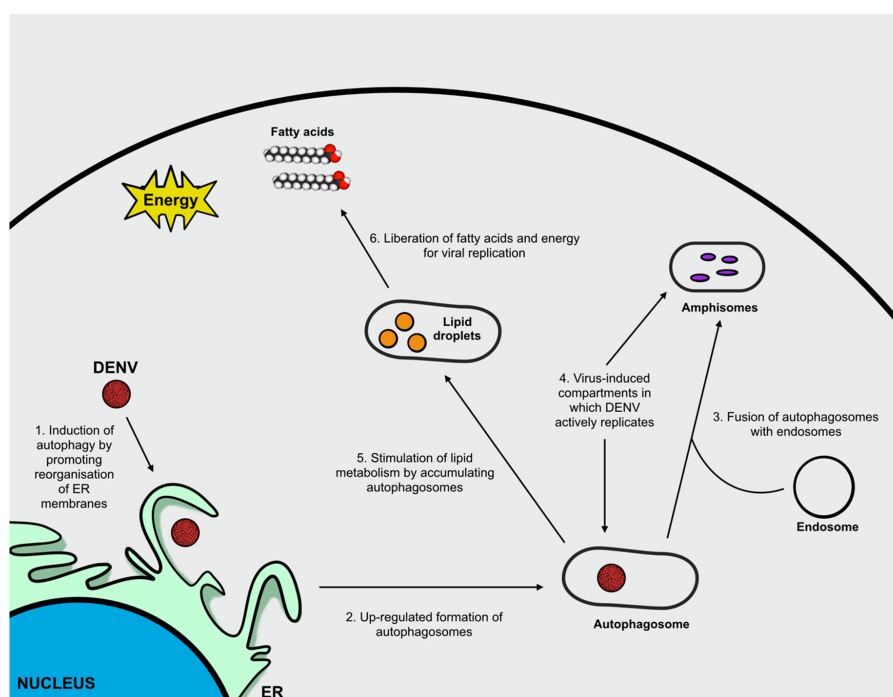


Figure 4. Deregulation of autophagy during Dengue virus infection. During DENV infection, autophagy has pro-viral activity. The induction of autophagy by DENV (1) upregulates autophagosomes formation (2) that fuse with endosomes to form amphisomes (3), virus-induced compartments in which DENV actively replicates (4). Accumulating autophagosomes stimulate lipid metabolism (5) leading to the liberation of fatty acids and energy to sustain viral replication (6).

Different studies have highlighted the important role of autophagy during ZIKV entry and replication after observing accumulating autophagic vesicles following viral infection *in vivo* and *in vitro*. Viral replication occurs primarily on the ER, where immature viral particles initially assemble. This stage of ZIKV infection induces ER stress, which in turn triggers autophagy activation. During this response, the non-structural proteins, NS4A and NS4B, seem to be involved in facilitating the curvature of ER membranes to generate platform sites for viral assembly, and inhibit Akt-mTORC

pathway, principally by limiting Akt levels of phosphorylation, to induce autophagy and increase viral replication and release (Figure 5) [49–52].

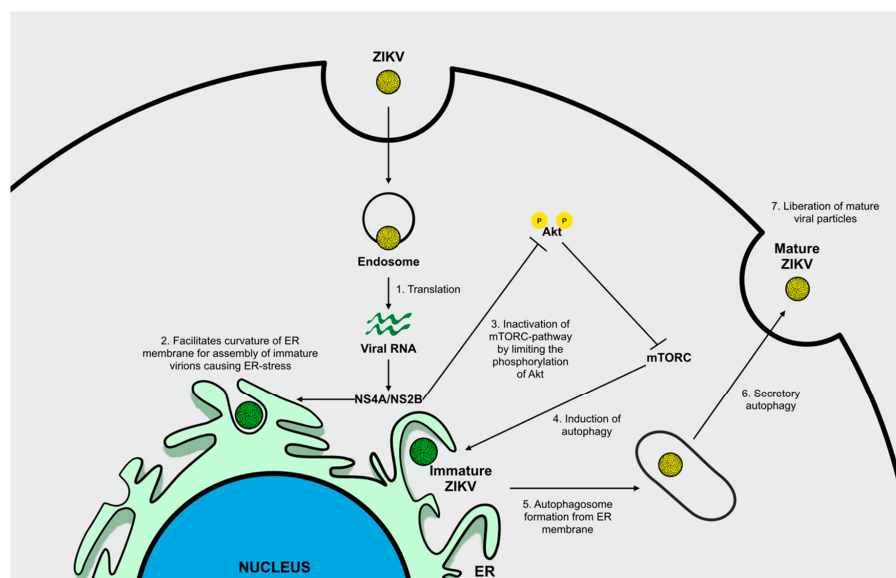


Figure 5. Deregulation of autophagy during ZIKV infection. Following ZIKV internalization, release of genomic material from endosomes and translation of viral RNA (1), NS4A and NS4B facilitate the curvature of ER membranes to promote assembly of immature viral particles (2) and inactivate the mTORC-pathway (3) by limiting Akt phosphorylation, thus inducing autophagy (5). The upregulation in autophagosome formation (5) activates secretory autophagy (6) with subsequent liberation of mature ZIKV particles (7).

Novel findings highlight important similarities between the mechanisms that DENV and ZIKV use in order to exploit autophagy during infection. Both DENV and ZIKV have been shown to induce the formation of LC3-containing membranes. Indeed, a common feature seems to be the requirement for LC3, which is targeted to viral-induced membranes through mechanisms other than cellular lipidation of the protein. The presence of LIR motifs in the polyproteins of ZIKV and DENV might be responsible for the viral-mediated localization of LC3 to cellular membranous compartments. Furthermore, autophagy components seem crucial for post-replication processes including viral maturation and packaging [53].

Despite these important similarities, DENV and ZIKV exploit a differential utilization of upstream components of the autophagic machinery, therefore, presumably promoting the activation of diverse upstream signaling cascades. The induction of autophagy by ZIKV appears to be linked to the activation of AMPK by phosphorylation, while DENV induces autophagy using a divergent route presumably involving the activation of VPS34 [53].

ZIKV Infection and Autophagy

In ZIKV and other *Flavivirus*, receptor-binding is mostly mediated by the interaction of *N*-glycans conjugated to viral protein E with C-type lectin receptors (CLRs) from host-cells [54], such as DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) [55–58], L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin) [58,59], MMR

(Macrophage mannose receptor) [60], and CLEC5A (C-type lectin member 5A) [61]. A more recent *in vitro* assay demonstrated that DC-SIGN mediates ZIKV entry into cells [62]. CLRs comprise a large family of carbohydrate receptors, which bind through one or more carbohydrate recognition domains [63]. These cellular receptors recognize carbohydrate in pathogens as PAMPs and act as PRRs, interiorizing these agents into endosomes, initiating the process of antigen presentation, and elimination of the pathogen [64]. Members of this family are usually expressed in myeloid cells, including macrophages, monocytes, and dendritic cells, thus these receptors play a central role in the early steps of activating the host's immune response [65].

Furthermore, ZIKA can acquire negatively charged lipids from the ER lumen during viral morphogenesis, mainly phosphatidylserine (PS). The PS of immature ZIKV particles misleads host cells and facilitates the infection of different tissues, including endothelial, neural, and placental [62,66–70]. These anionic lipids are known to bind cellular lipid receptors from two distinct families: TAM (Receptor tyrosine kinases: TYRO3, AXL and MER) and TIM (T-cell immunoglobulin mucin: TIM1, TIM3 and TIM4) [71–73]. TIM receptors bind PS directly, whereas TAMs bind it indirectly, through a process that requires the presence of GAS6 (Growth-arrest-specific 6) or PROS (Protein S) as bridging molecules [72,74,75]. TAM receptors are expressed on the surface of macrophages, dendritic cells [76], Sertoli cells (testis) [77], retinal pigment epithelial cells [78], and neuronal cells, such as Purkinje and dentate gyrus cells [79]. In contrast, TIM receptors are mostly expressed by immune system cells, especially T cells [80,81].

The ZIKV maturation process occurs in the trans-Golgi network (TGN), where the host's protease furin cleaves protein prM of immature particles (C, prM, and E), dissociating the pr portion from the viral particle, and releasing mature particles (C, M, and E) [82,83]. Abrogating this step leads to improper reorganization of protein E and consequent exposure of the viral membrane exhibiting prM and PS. This culminates with the release of immature viral particles exhibiting not only protein E, but also prM and PS, which could contribute to a wider range of cells susceptible to ZIKV. Additionally, a single mutation in prM was shown to be associated with the ability of ZIKV to infect cells, suggesting that prM could also act as an entry receptor [84]. Therefore, ZIKV entry into cells seems to be a process dependent on the degree of particle maturation, where multiple molecules can be explored for infectious entry dictating cell tropism.

Following association with one or more host receptors, ZIKV infiltrates cells through clathrin-mediated endocytosis [85], a vesicular trafficking process that transports cargo molecules from the cell surface to its interior [86]. Initially, a pre-existing clathrin-coated pit enfolds viral particles and the invagination on the plasma membrane is closed by excision of the dynamin-mediated membrane to form a clathrin-coated vesicle. Subsequently, the endocytic vesicle carrying the virus is delivered to the initial endosomes, which mature into late endosomes [87]. Then, the acidic pH of the endosome compartment triggers a conformational change in protein E, leading to viral membrane fusion with the endosome membrane and further release of viral RNA into the cytoplasm, enabling replication and translation processes [88]. In this regard, chloroquine is thought to inhibit membrane fusion by raising the pH in the lumen of endosomes (Figure 6) [89].

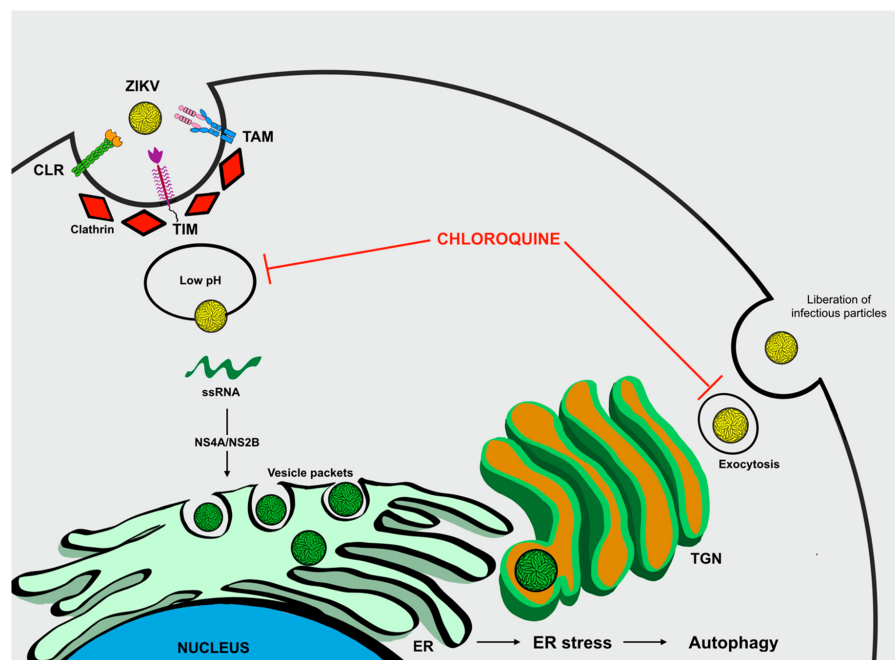


Figure 6. The role of autophagy in ZIKV infection. The ZIKV entry mechanism is mediated by a wide range of receptors. After membrane fusion, viral genetic material is released into the cytoplasm and translated into proteins. The formation of vesicle packets causes ER stress and triggers autophagy. Chloroquine acts by increasing the pH within the endosomes, inhibiting membrane fusion and exocytosis by secretory autophagy.

Viral replication machinery is established at the ER membrane, which undergoes a structural rearrangement mediated by ZIKV structural proteins, NS4A and NS4B [90]. These invaginations inside the ER lumen are termed “vesicle packets”, and provide an ideal environment for biogenesis. The formation of these replication complexes causes ER stress, which is thought to be the main mechanism by which autophagy is triggered during ZIKV infection [49]. NS4A and NS4B have also been shown to promote autophagy in HeLa and fetal neural stem cells by inhibiting the Akt-mTOR pathway, thus increasing ZIKV replication and preventing neurogenesis [51].

During morphogenesis, the newly synthesized viral genomes are assembled into virions that bud into the ER lumen, thus the viral membrane ends up reflecting the ER membrane composition, which has PS in its luminal leaflet [91]. Then, these particles traffic through the TGN, for maturation, and further secretory pathways [82].

It is important to note that proteins lacking the N-terminal leader peptides cannot enter the ER-TGN pathway for secretion. These proteins, such as viral polypeptides, may be exported unconventionally through secretory autophagy [90]. Different from degradative autophagy, the secretory autophagy machinery causes the secretion of viral particles instead of their degradation [37]. Therefore, ZIKV may exploit secretory autophagy to facilitate the release of mature viral particles. Nevertheless, the mechanisms by which secretory autophagy branches from degradative autophagy and how ZIKV explores it, are not yet understood. On this matter, an alkalizer drug such as chloroquine may inhibit secretory autophagy and suppress degradative autophagy once acidic pH is necessary for the activation of lysosomal hydrolases.

4. Therapy Development and Approaches to Counteract ZIKV Infection

ZIKV is a recent emerging infectious disease characterized by its rapid spread and high virulence. Clinical manifestations following infection are generally mild, self-limited, and non-specific, which include symptoms such as fever, headache, arthralgia, myalgia, asthenia, and non-purulent conjunctivitis, found to be very similar to those caused by other arboviruses, therefore confounding the diagnosis [2]. Nevertheless, more severe outcomes have been described including the development of microcephaly in newborns, and grave neurological impairments in adults such as the Guillain Barré syndrome (GBS) [89,92–94]. These complications possibly correlate with the unavailability of vaccines, therapies, or effective prophylactic strategies to counteract the infection [95]. Different ZIKV vaccine candidates are currently under development, and clinical trials entail nucleic acid based vaccines (RNA or DNA), virus-like particle, recombinant, and vectored vaccines [89,96]. Other than acetaminophen to control pain and fever, administration of fluids to prevent dehydration, and anti-histamines to prevent rushes, no specific anti-viral drugs for ZIKV have yet been identified. Recently, several compounds have been tested in order to assess a possible effective therapeutic strategy to neutralize the infection [95]. Indeed, in a scenario lacking accepted anti-ZIKV treatments, researchers are proceeding with testing repurposed available drugs already approved for use in pregnant woman, which seems to be the most effective way for reducing viral infection in adults and to limit birth defects in newborns.

What has emerged is the necessity to investigate the genetic and molecular components underlining ZIKV biology and viral pathogenicity. Knowledge of the exact molecular processes and effectors mediating all the different stages of viral replication and host cell-virus interactions, are crucial in order to test repurposed or newly designed drugs that can be used as anti-viral agents against ZIKV.

Targeting Autophagy to Limit ZIKV Infection: A Perspective Approach

Compound testing and drug design to block receptor binding, endosomal fusion, viral replication, and release from host cells is of contingent need to make rapid progress in the development of novel therapies that might work efficiently to fight ZIKV.

Based on novel and crucial findings related to autophagy in promoting viral replication and progression of infection, we describe the activity of chloroquine, a compound found to efficiently limit ZIKV infection in vivo and in vitro. We also highlight other compounds known to act on autophagy, for which we suggest further testing to identify those with anti-ZIKV activity. Our intent is to highlight the importance of targeting autophagy to limit ZIKV infection.

Chloroquine (CQ) is an FDA-approved antimalarial compound with high tolerability, low cost, and immunomodulatory properties for which no substantiated reports indicate an association between drug administration and fetal harm or risk during pregnancy [97]. Due to its interesting properties, the usage of CQ has been repurposed also against other pathogens. Specifically, CQ has recently been seen to counteract ZIKV infection in different in vivo and in vitro models [50,97,98].

CQ is a 9-aminoquinolone, possessing multiple biochemical properties with direct antiviral effects. CQ is a weak base capable of reaching intracellular compartments, and is concentrated within acidic organelles including lysosomes, Golgi vesicles and endosomes. CQ acts by increasing the pH acidic organelles, therefore, disrupting the activity of several enzymes (e.g., acidic hydroxylases) and inhibiting protein post-translational modifications. It is therefore clear that CQ can disrupt the pH-dependent stages of viral replication for several members of the *Flaviviridae*, *Retroviridae*, and *Coronaviridae* families [99–101].

In the case of ZIKV infection, the acidic pH of endosome compartments is crucial for triggering conformational changes of viral glycoproteins thus allowing the fusion of the viral and endosomal membranes with subsequent release of viral RNA into the cytoplasm, enabling replication and translation processes [88]. In this context, CQ might act by inhibiting membrane fusion by raising the pH in the lumen of endosomes [89].

Altering the pH in the ER compartment and TGN vesicles is thought to allow CQ to limit post-translational modifications of viral glycoproteins occurring in these districts since residing glycosyl-transferases and proteases require low pH [99,102]. In addition, pH increase caused by CQ, impairs the normal proteolytic processing of prM to M thus impairing viral infectivity [103].

Endosomes, ER, and TGN are cellular organelles that exert fundamental roles of ensuring a correct initiation, progression, and completion of autophagic flux. Therefore, altering the homeostasis of these compartments will inhibit the autophagic response. CQ negatively interferes in the fusion of autophagosomes with lysosomes, causing an accumulation of sequestered materials, including viral particles, either in autophagosomes or autophagolysosomes [104]. We can hypothesize that a possible mechanism through which ZIKV might exploit secretory autophagy and suppress degradative autophagy to facilitate the release of mature viral particles might reside in the alkalizer properties of CQ since acidic pH is necessary for the activation of lysosomal hydrolases.

Even though the activity of CQ seems promising in counteracting ZIKV infection, some controversial findings have been also reported. In an interesting work conducted by Adcock et al., CQ failed to inhibit ZIKV replication in their in vitro model, and showed higher cytotoxicity when compared to other CQ analogues [105]. Nevertheless, it is important to notice that CQ has been reported to decrease the number of ZIKV-infected neural cells in diverse cell models [89]. These different results highlight an important aspect to consider when testing potential anti-*Flavivirus* agents: *Flavivirus* entry and replication mechanisms are cell-specific, which might also render the effects of putative inhibitors cell-specific [105]; consequently, each compound should be tested on several host cell models prior to its consideration as a potential drug for limiting ZIKV infection.

Apart from CQ, other autophagy inhibiting lysosomotropic agents might be tested to reveal a possible anti-ZIKV activity and they include: Lys05, a bivalent aminoquinoline that causes a significant augmentation in lysosomal pH [106]; ARN5187, autophagosome maturation blocker [107]; and Quinacrine, anti-malarial drug acting as inhibitor of endosome/lysosome acidification [108].

Catalytic inhibitors of ULK kinase including MRT68921, Compound 6, and SBI-0206965, even if at the very early stages of drug discovery, seem promising in targeting the autophagic process [109,110].

Compounds that inhibit the later stages of autophagy, the degradation of autophagosome content by lysosome enzymes, might also be considered as effective agents against ZIKV which include: Pepstatin A and E64d, inhibitors of lysosomal proteases [111]; clomipramine, a FDA-approved drug for psychiatric disorders, which possesses an active metabolite (desmethylclomipramine) known to block autophagosome-lysosome fusion [112]; lucaanthone, disrupts lysosomal membrane permeabilization [113]; Bafilomycin A1, inhibitor of the V-ATPase, which leads to the disruption of autolysosome acidification and to autophagosome-lysosome fusion [114]; Quinacrine, prevents the fusion of autophagosomes and lysosomes [108]; Quinacrine, Mefloquine, and GSK369796, inhibit the activity of the lysosomal cathepsin B presumably by direct binding to the enzyme [108].

As already indicated, the PI3K/Akt/mTORC signaling pathway is the main intracellular route involved in regulating the progression of autophagic flux in presence of various stress stimuli, including viral infections. We therefore suggest that testing well-established compounds known to alter the PI3K/Akt/mTORC axis should be executed to identify other potential drugs that could limit ZIKV infection. To support our hypothesis there has been a recent report demonstrating that pharmacological inhibition of autophagy using wortmannin—a microbial product and inhibitor of the early stages of autophagy by blocking PI3K—is associated to a reduction in ZIKV production in an in vitro model of human umbilical vein endothelial cells [50]. Other PI3K-blockers have been used as autophagy inhibitors such as: 3-methyladenine, widely used to inhibit autophagy in vitro [115,116]; and LY294002, the first synthetic inhibitor of PI3K (Figure 7) [115,117].

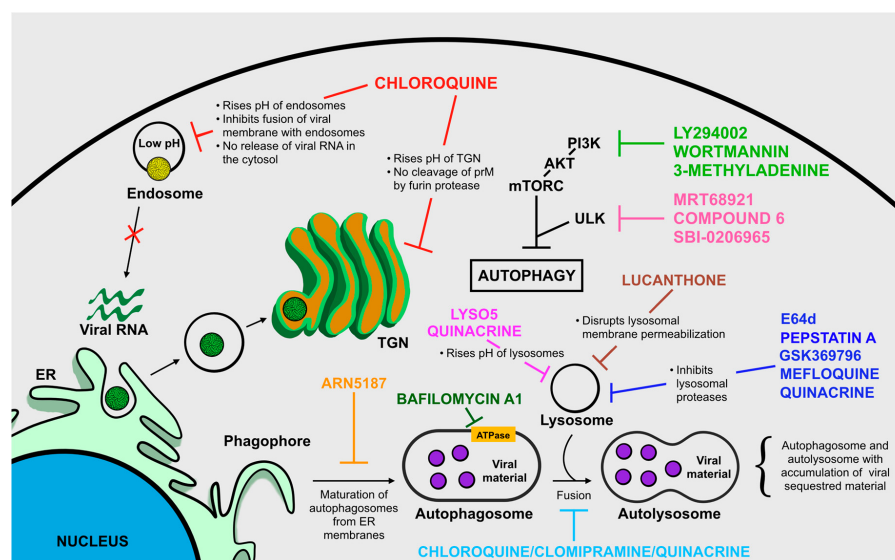


Figure 7. Compound testing and drug design to limit autophagy: a possible approach to counteract ZIKV infection. Different compounds possess the ability to modulate crucial steps for autophagy progression. Considering the fundamental role of autophagy in promoting viral replication and advancement of infection, the testing of molecules known to act on autophagy might be essential to identify and select candidates to test for anti-ZIKV activity.

5. Conclusions

ZIKV infection still constitutes an ongoing challenge that requires strict surveillance and attention. There is the necessity to unravel ZIKV biology and the mechanisms involved in virus–host cell interactions in order to develop potential vaccines, therapies, and prophylactic regimes to counteract viral infection since they are not yet available. Recent findings support the assumption that autophagy might represent a potential target for therapeutic purposes. Therefore, understanding the specific molecular details of how ZIKV is able to engage autophagy will certainly clarify the roles of autophagic flux in viral replication and progression, and may help to assess effective therapeutics to potentially treat disease and control virus infection.

Author Contributions: R.G. and A.A. designed the work and prepared the original draft of the review; R.G., A.A., and P.M.T. generated images and tables; R.G., A.A., P.M.T., L.B., and S.C. critically reviewed and edited the manuscript. All authors received and reviewed the final draft.

Funding: This research was funded by the National Council for the Improvement of Higher Education, Brazil (CAPES), Finance Code 001; the National Council for Scientific and Technological Development, Brazil (CNPq); the Department of Science and Technology of the Ministry of Health, Brazil (Decit/SCTIE/MS); and by the IRCCS Burlo Garofolo grant “Ricerca Corrente” RC09/17.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Maharajan, M.K.; Ranjan, A.; Chu, J.F.; Foo, W.L.; Chai, Z.X.; Lau, E.Y.; Ye, H.M.; Theam, X.J.; Lok, Y.L. Zika Virus Infection: Current Concerns and Perspectives. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2016**, *51*, 383–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Martinez, J.D.; Garza, J.A.C.; Cuellar-Barboza, A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. *Dermatol. Clin.* **2019**, *37*, 95–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Musso, D.; Cao-Lormeau, V.M. Is the Zika threat over? *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 566–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 40 de 2018. *Boletim Epidemiológico* **2018**, *49*, 1–8.
5. Lin, H.H.; Yip, B.S.; Huang, L.M.; Wu, S.C. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 47–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Routhu, N.K.; Byrareddy, S.N. Virus Interaction of Zika Virus in Modulating Disease Pathogenesis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2017**, *12*, 219–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Esteves, E.; Rosa, N.; Correia, M.J.; Arrais, J.P.; Barros, M. New Targets for Zika Virus Determined by Human-Viral Interactomic: A Bioinformatics Approach. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 1734151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Carneiro, L.A.; Travassos, L.H. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Microbes Infect.* **2016**, *18*, 169–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lee, I.; Bos, S.; Li, G.; Wang, S.; Gadea, G.; Després, P.; Zhao, R.Y. Probing Molecular Insight into Zika Virus Host Interactions. *Viruses* **2018**, *10*, 233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ke, P.Y. The Multifaceted Roles of Autophagy in Flavivirus-Host Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **2008**, *132*, 27–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Feng, Y.; He, D.; Yao, Z.; Klionsky, D.J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **2014**, *24*, 24–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 77–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Giménez-Xavier, P.; Francisco, R.; Palatini, F.; Pérez, R.; Ambrosio, S. LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 781–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Katsuragi, Y.; Ichimura, Y.; Komatsu, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* **2015**, *282*, 4672–4678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chiramel, A.I.; Brady, N.R.; Bartenschlager, R. Divergent Roles of Autophagy in Virus Infection. *Cells* **2013**, *2*, 83–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Deretic, V.; Saitoh, T.; Akira, S. Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 722–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Richetta, C.; Faure, M. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cell Microbiol.* **2013**, *15*, 368–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gannage, M.; Münz, C. MHC presentation via autophagy and how viruses escape from it. *Semin. Immunopathol.* **2010**, *32*, 373–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Arroyo, D.S.; Gaviglio, E.A.; Peralta Ramos, J.M.; Bussi, C.; Rodriguez-Galan, M.C.; Iribarren, P. Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *18*, 55–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Shoji-Kawata, S.; Levine, B. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 1478–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thompson, J.M.; Iwasaki, A. Toll-Like Receptors Regulation of Viral Infection and Disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 786–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nabar, N.R.; Chi, C.S.; Kehrl, J.H. Chapter 6: Signaling by Toll-Like Receptors Induces Autophagy Through Modification in Beclin 1: Molecular Mechanism. In *Immunotoxicology, Immunopathology and Immunotherapy*, 1st ed.; Hyat, M.A., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; Volume 1, pp. 75–84.
24. Ahmad, L.; Mostow, S.; Sancho-Shimizu, V. Autophagy-Virus Interplay: From Cell Biology to Human Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Latz, E.; Xiao, T.S.; Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 397–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jounai, N.; Takeshita, F.; Kobiyama, K.; Sawano, A.; Miyawaki, A.; Xin, K.Q.; Ishii, K.J.; Kawai, T.; Akira, S.; Suzuki, K.; et al. The Atg5–Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14050–14055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Petrilli, V.; Dostert, C.; Muruve, D.A.; Tschopp, J. The inflammasome: A danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19*, 615–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kanneganti, T.D.; Lamkanfi, M.; Nunez, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **2007**, *27*, 549–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kim, Y.C.; Guan, K.L. mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kroemer, G.; Marino, G.; Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 280–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Meijer, A.J.; Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2445–2462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Long, X.; Lin, Y.; Ortiz-Vega, S.; Yonezawa, K.; Avruch, J. Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 702–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Amaya, C.; Marcelo Fader, C.; Colombo, M.I. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3343–3353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bento, C.F.; Puri, C.; Moreau, K.; Rubinsztein, D.C. The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 1059–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. LoPiccolo, J.; Blumenthal, G.M.; Bernstein, W.B.; Dennis, P.A. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist. Updat.* **2008**, *11*, 32–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Blázquez, A.; Escribano-Romero, E.; Merino-Ramos, T.; Saiz, J.; Martín-Acebes, M.A. Stress responses in flavivirus-infected cells: Activation of unfolded protein response and autophagy. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ponpuak, M.; Mandell, M.; Kimura, T.; Chauhan, S.; Cleyrat, C.; Deretiv, V. Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *35*, 106–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhang, Z.W.; Li, Z.L.; Yuan, S. The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *6*, 206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Li, J.K.; Liang, J.J.; Liao, C.L.; Lin, Y.L. Autophagy is involved in the early step of Japanese encephalitis virus infection. *Microbes Infect.* **2012**, *14*, 159–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ashraf, U.; Ye, J.; Ruan, X.; Wan, S.; Zhu, B.; Cao, S. Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. *Viruses* **2015**, *7*, 219–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Yu, C.Y.; Hsu, Y.W.; Liao, C.L.; Lin, Y.L. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11868–11880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Blázquez, A.B.; Escribano-Romero, E.; Merino-Ramos, T.; Saiz, J.C.; Martín-Acebes, M.A. Infection with Usutu virus induces an autophagic response in mammalian cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Martín-Acebes, M.A.; Blázquez, A.B.; Saiz, J.C. Reconciling West Nile virus with the autophagic pathway. *Autophagy* **2015**, *11*, 861–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Blázquez, A.B.; Martín-Acebes, M.A.; Saiz, J.C. Amino acid substitutions in the non-structural proteins 4A or 4B modulate the induction of autophagy in West Nile virus infected cells independently of the activation of the unfolded protein response. *Front. Microbiol.* **2015**, *5*, 797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Beatman, E.; Oyer, R.; Shives, K.D.; Headman, K.; Brault, A.C.; Tyler, K.L.; Beckham, J.D. West Nile virus growth is independent of autophagy activation. *Virology* **2012**, *433*, 262–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vandergaast, R.; Fredericksen, B.L. West Nile virus (WNV) replication is independent of autophagy in mammalian cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Randall, G. Lipid Droplet Metabolism during Dengue Virus Infection. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 640–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Heaton, N.S.; Randall, G. Dengue Virus and Autophagy. *Viruses* **2011**, *3*, 1332–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Chiramel, A.I.; Best, S.M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Res.* **2018**, *254*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Peng, H.; Liu, B.; Yves, T.D.; He, Y.; Wang, S.; Tang, H.; Ren, H.; Zhao, P.; Qi, Z.; Qin, Z. Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Viruses* **2018**, *10*, 259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Liang, Q.; Luo, Z.; Zeng, J.; Chen, W.; Foo, S.; Lee, S.; Ge, J.; Wang, S.; Goldman, S.A.; Zlokovic, B.V.; et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 663–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cao, B.; Parnell, L.A.; Diamond, M.S.; Mysorekar, I.U. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2303–2313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Abernathy, E.; Mateo, R.; Majzoub, K.; van Buuren, N.; Bird, S.W.; Carette, J.E.; Kirkegaard, K. Differential and convergent utilization of autophagy components by positive-strand RNA viruses. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e2006926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Smit, J.M.; Moesker, B.; Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* **2011**, *3*, 160–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lozach, P.Y.; Burleigh, L.; Staropoli, I.; Navarro-Sanchez, E.; Harriague, J.; Virelizier, J.L.; Rey, F.A.; Desprès, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Amara, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23698–23708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tassaneetrithep, B.; Burgess, T.H.; Granelli-Piperno, A.; Trumpfheller, C.; Finke, J.; Sun, W.; Eller, M.A.; Pattanapanyasat, K.; Sarasombath, S.; Birx, D.L.; et al. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 823–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hacker, K.; White, L.; de Silva, A.M. N-linked glycans on dengue viruses grown in mammalian and insect cells. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2097–2106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Navarro-Sanchez, E.; Altmeyer, R.; Amara, A.; Schwartz, O.; Fieschi, F.; Virelizier, J.L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Desprès, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 723–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wang, P.; Hu, K.; Luo, S.; Zhang, M.; Deng, X.; Li, C.; Jin, W.; Hu, B.; He, S.; Li, M.; et al. DC-SIGN as an attachment factor mediates Japanese encephalitis virus infection of human dendritic cells via interaction with a single high-mannose residue of viral E glycoprotein. *Virology* **2016**, *488*, 108–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Miller, J.L.; deWet, B.J.M.; Martinez-Pomares, L.; Radcliffe, C.M.; Dwek, R.A.; Rudd, P.M.; Gordon, S. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e17. [[CrossRef](#)]
61. Chen, S.T.; Lin, Y.L.; Huang, M.T.; Wu, M.F.; Cheng, S.C.; Lei, H.Y.; Lee, C.K.; Chiou, T.W.; Wong, C.H.; Hsieh, S.L. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* **2008**, *453*, 672–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hamel, R.; Dejarnac, O.; Wichit, S.; Ekchariyawat, P.; Neyret, A.; Luplertlop, N.; Perera-Lecoin, M.; Surasombattapattana, P.; Talignani, L.; Thomas, F.; et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8880–8896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zelensky, A.N.; Gready, J.E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **2005**, *272*, 6179–6217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Cambi, A.; Koopman, M.; Figdor, C.G. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* **2005**, *7*, 481–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kim, S.Y.; Li, B.; Linhardt, R.J. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Liu, S.; Delalio, L.J.; Isakson, B.E.; Wang, T.T. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 1183–1189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Retallack, H.; Di, E.; Arias, C.; Knopp, K.A.; Laurie, M.T. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 14408–14413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Tang, H.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Wen, Z.; Qian, X.; Li, Y.; Yao, B.; Shin, J.; Zhang, F.; Lee, E.M. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 587–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Tabata, T.; Pettitt, M.; Puerta-Guardo, H.; Fang-Hoover, J.; Harris, E.; Tabata, T.; Pettitt, M.; Puerta-Guardo, H.; Michlmayr, D.; Wang, C.; et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 155–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

70. Wells, M.F.; Salick, M.R.; Wiskow, O.; Ho, D.J.; Worringer, K.A.; Ihry, R.J.; Kommineni, S.; Bilican, B.; Klim, J.R.; Hill, E.J.; et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 703–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Perera-Lecoin, M.; Meertens, L.; Carnec, X.; Amara, A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses* **2013**, *6*, 69–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Meertens, L.; Carnec, X.; Lecoin, M.P.; Guivel-Benhassine, F.; Lew, E.; Lemke, G.; Schwartz, O.; Amara, A. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 544–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Rey, A.; Stiasny, K.; Heinz, F.X. Flavivirus structural heterogeneity: Implications for cell entry. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *24*, 132–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Lemke, G.; Rothlin, C.V. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 327–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Hafizi, S.; Dahlbäck, B. Gas6 and protein S Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J.* **2006**, *273*, 5231–5244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Seitz, H.M.; Camenisch, T.D.; Lemke, G.; Earp, S.; Matsushima, G.K.; Seitz, H.M.; Camenisch, T.D.; Lemke, G.; Earp, H.S.; Matsushima, G.K. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* **2007**, *78*, 5635–5642. [[CrossRef](#)]
77. Lu, Q.; Gore, M.; Zhang, Q.; Camenisch, T.; Boast, S.; Casagrande, F.; Lai, C.; Skinner, M.K.; Klein, R.; Matsushima, G.K.; et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis Targeting vector. *Nature* **1999**, *398*, 723–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Prasad, D.; Rothlin, C.V.; Burrola, P.; Burstyn-Cohen, T.; Lu, Q.; Garcia de Frutos, P.; Lemke, G. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol. Cell Neurosci.* **2006**, *33*, 96–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Prieto, A.L.; Weber, J.L.; Lai, C. Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **2000**, *425*, 295–314. [[CrossRef](#)]
80. Freeman, G.J.; Casanovas, J.M.; Umetsu, D.T.; DeKryuff, R.H. TIM genes: A family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **2010**, *235*, 172–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Su, E.W.; Lin, J.Y.; Kane, L.P. TIM-1 and TIM-3 Proteins in Immune Regulation. *Cytokine* **2008**, *44*, 9–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* **2012**, *55*, 289–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zhang, Y.; Kaufmann, B.; Chipman, P.R.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. Structure of Immature West Nile Virus. *J. Virol.* **2007**, *81*, 6141–6145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Yuan, L.; Huang, X.Y.; Liu, Z.Y.; Zhang, F.; Zhu, X.L.; Yu, J.Y.; Ji, X.; Xu, Y.P.; Li, G.; Li, C.; et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* **2017**, *358*, 933–936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Meertens, L.; Labeau, A.; Dejarnac, O.; Cipriani, S.; Sinigaglia, L.; Bonnet-Madin, L.; Le Charpentier, T.; Hafirassou, M.L.; Zamborini, A.; Cao-Lormeau, V.M.; et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 324–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Mousavi, S.A.; Malerød, L.; Berg, T.; Kjekshus, R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Mercer, J.; Schelhaas, M.; Helenius, A. Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 803–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Yu, I.M.; Zhang, W.; Holdaway, H.A.; Li, L.; Kostyuchenko, V.A.; Chipman, P.R.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G.; Chen, J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* **2008**, *319*, 1834–1837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Munjal, A.; Khandia, R.; Dhama, K.; Sachan, S.; Karthik, K.; Ruchi, T.; Malik, Y.S.; Kumar, D.; Singh, R.K.; Iqbal, H.M.N.; et al. Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Ojha, C.R.; Rodriguez, M.; Lapiere, J.; Karuppan, M.K.M.; Branscome, H.; Kashanchi, F.; El-Hage, N. Complementary Mechanisms Potentially Involved in the Pathology of Zika Virus. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

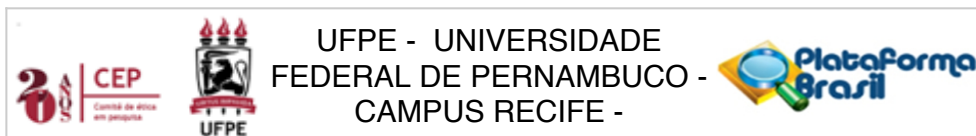
91. Kay, J.G.; Koivusalo, M.; Ma, X.; Wohland, T.; Grinstein, S.; Gruenberg, J.E. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2198–2212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Cao-Lormeau, V.M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
93. Mlakar, J.; Korva, M.; Tul, N.; Popović, M.; Poljak-Prijatelj, M.; Mraz, J.; Kolenc, M.; Resman Rus, K.; Vesnaver Vipotnik, T.; Fabjan Vodusek, V.; et al. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 951–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Carteaux, G.; Maquart, M.; Bedet, A.; Contou, D.; Brugières, P.; Fourati, S.; Cleret de Langavant, L.; de Broucker, T.; Brun-Buisson, C.; Leparç-Goffart, I.; et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1595–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mukherjee, S.; Era, N. Zika virus disease: Global concerns and making way through it. *Communit. Acquir. Infect.* **2016**, *3*, 31–35. [[CrossRef](#)]
96. Wahid, B.; Ali, A.; Rafique, S.; Idrees, M. Current status of therapeutic and vaccine approaches against Zika virus. *Eur. J. Intern. Med.* **2017**, *44*, 12–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Shiryayev, S.A.; Mesci, P.; Pinto, A.; Fernandes, I.; Sheets, N.; Shresta, S.; Farhy, C.; Huang, C.T.; Strongin, A.Y.; Muotri, A.R.; et al. Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika Virus treatment and prophylaxis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Li, C.; Zhu, X.; Ji, X.; Quanquin, N.; Deng, Y.Q.; Tian, M.; Aliyari, R.; Zuo, X.; Yuan, L.; Afridi, S.K.; et al. Chloroquine, a FDA-approved Drug, Prevents Zika Virus Infection and its Associated Congenital Microcephaly in Mice. *EBioMedicine* **2017**, *24*, 189–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Savarino, A.; Boleaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: An old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 722–727. [[CrossRef](#)]
100. Legssyer, R.; Josse, C.; Piette, J.; Ward, R.J.; Crichton, R.R. Changes in function of iron-loaded alveolar macrophages after in vivo administration of desferrioxamine and/or chloroquine. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 36–42. [[CrossRef](#)]
101. Byrd, T.F.; Horwitz, M.A. Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. A potential new mechanism for the therapeutic effect of chloroquine against intracellular pathogens. *J. Clin. Investig.* **1991**, *88*, 351–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Ferreira, D.F.; Santo, M.P.; Rebello, M.A.; Rebello, M.C. Weak bases affect late stages of Mayaro virus replication cycle in vertebrate cells. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 313–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Tsai, W.P.; Nara, P.L.; Kung, H.F.; Oroszlan, S. Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1990**, *6*, 481–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Solitro, A.R.; MacKeigan, J.P. Leaving the lysosome behind: Novel developments in autophagy inhibition. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 73–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Adcock, R.S.; Chu, Y.K.; Golden, J.E.; Chung, D.H. Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. *Antivir. Res.* **2017**, *138*, 47–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. McAfee, Q.; Zhang, Z.; Samanta, A.; Levi, S.M.; Ma, X.H.; Piao, S.; Lynch, J.P.; Uehara, T.; Sepulveda, A.R.; Davis, L.E.; et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8253–8258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. De Mei, C.; Ercolani, L.; Parodi, C.; Veronesi, M.; Lo Vecchio, C.; Bottegoni, G.; Torrente, E.; Scarpelli, R.; Marotta, R.; Ruffili, R.; et al. Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene* **2015**, *34*, 2597–2608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Balasubramanian, A.; Teramoto, T.; Kulkarni, A.A.; Bhattacharjee, A.K.; Padmanabhan, R. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiv. Res.* **2017**, *137*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Egan, D.F.; Chun, M.G.; Vamos, M.; Zou, H.; Rong, J.; Miller, C.J.; Lou, H.J.; Raveendra-Panickar, D.; Yang, C.C.; Sheffler, D.J.; et al. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. *Mol. Cell* **2015**, *59*, 285–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

110. Petherick, K.J.; Conway, O.J.L.; Mpamhanga, C.; Osborne, S.A.; Kamal, A.; Saxty, B.; Ganley, I.G. Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)- dependent autophagy. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 11376–11383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Ni, H.M.; Bockus, A.; Wozniak, A.L.; Jones, K.; Weinman, S.; Yin, X.M.; Ding, W.X. Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* **2011**, *7*, 188–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Rossi, M.; Munarriz, E.R.; Bartesaghi, S.; Milanese, M.; Dinsdale, D.; Guerra-Martin, M.A.; Bampton, E.T.; Glynn, P.; Bonanno, G.; Knight, R.A.; et al. Desmethylclomipramine induces the accumulation of autophagy markers by blocking autophagic flux. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 3330–3339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Carew, J.S.; Espitia, C.M.; Esquivel, J.A., 2nd; Mahalingam, D.; Kelly, K.R.; Reddy, G.; Giles, F.J.; Nawrocki, S.T. Lucanthone is a novel inhibitor of autophagy that induces cathepsin D-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6602–6613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Mauvezin, C.; Neufeld, T.P. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **2015**, *11*, 1437–1438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Seglen, P.O.; Gordon, P.B. 3-methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 1889–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Vinod, V.; Padmakrishnan, C.J.; Vijayan, B.; Gopala, S. How can I halt thee? The puzzles involved in autophagic inhibition. *Pharmacol. Res.* **2014**, *82*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Blommaert, E.F.; Krause, U.; Schellens, J.P.; Vreeling-Sindelárová, H.; Meijer, A.J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 240–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES GENÉTICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA

Pesquisador: Almerinda Agrelli

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 03110818.8.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP
Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.135.383

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Pesquisa do Prof. Dr.Sérgio Crovella, Professor Titular do Departamento de Genética da UFPE e coordenador do projeto, que visa identificar os Fatores Genéticos e Moleculares Envolvidos na Patogênese da Infecção Por Vírus ZIKA

A equipe será composta pelos seguintes pesquisadores:

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão, Professor Adjunto do Departamento de Patologia (UFPE),

Ronald Rodrigues de Moura, Doutor em Genética – CCB (UFPE);

Almerinda Agrelli Doutoranda em Biologia Aplicada a saúde – LIKA (UFPE)

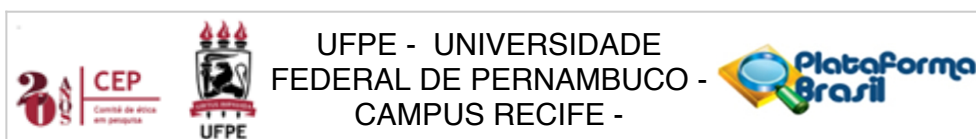
Heitor Horlando Sampaio Araújo da Silva, Aluno de Iniciação Científica - LIKA (UFPE)

Heverton Valentim Colaço da Silva, Mestrando em Patologia – CCS (UFPE)

Natalia Pereira da Silva, Aluna de Iniciação Científica – LIKA (UFPE)

O desenho do estudo consiste em caso-controle e recrutará pacientes nas maternidades cadastradas no Instituto Círculo do Coração com quadro clínico sugestivo de infecção por ZIKV e soropositividade ao vírus em qualquer período gestacional, cujos fetos apresentem ou não alterações neurológicas. Os com alterações serão considerados casos, e os que não apresentarem

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.383

constituirão o grupo controle. Também serão recrutados os pais e mães das crianças com desordens neurológicas, assim como a criança em acompanhamento médico, para análise de fatores genéticos ligados à infecção. Está previsto o recrutamento de 300 voluntários. Numa outra abordagem, serão recrutados voluntários do estado de Pernambuco para análise do perfil sorológico de infecção e pós-infecção aos vírus ZIKV e DENV, sendo estimada a participação de 1.000 voluntários. Ambos os grupos serão testados para infecções prévias aos quatro vírus da Dengue.

Serão aplicados questionários e promovida revisão dos prontuários para análises subsequentes. Será coletado também de 5-10mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante (EDTA), para análises laboratoriais.

O estudo será realizado em parceria com a Fundação de Apoio Círculo do Coração (CirCor), que é cadastrada em mais de 20 Centros Materno-Infantis do estado da Paraíba, do Hospital da rede estadual Mestre Vitalino, situado na cidade de Caruaru. O processamento biológico (análise sorológica e genômica) das amostras será realizado no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão vinculado à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os pesquisadores elaboraram a hipótese de que, devido à semelhança entre os DENV e o ZIKV, os indivíduos previamente expostos aos subtipos do vírus da Dengue e portadores de anticorpos específicos para esses subtipos virais, possam apresentar o Fenômeno de Facilitação por Anticorpos (Antibody Dependent Enhancement – ADE) na infecção por ZIKV, facilitando a entrada viral e o exacerbamento da resposta imunológica, podendo provocar dano tecidual neurológico, característico das formas graves da doença. Adicionalmente, a variabilidade genética do hospedeiro pode estar envolvida na susceptibilidade à infecção pelo ZIKV e DENV, bem como no desenvolvimento de desordens neurológicas e microcefalia.

Objetivo da Pesquisa:

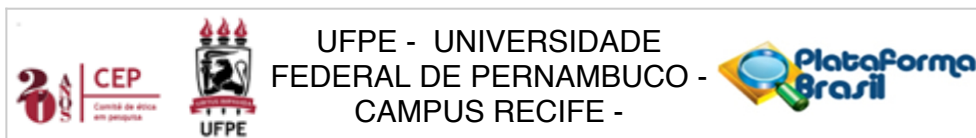
Objetivo geral:

Investigar fatores genéticos e moleculares envolvidos na patogênese da infecção por vírus Zika.

Objetivos específicos

Estimar a prevalência de pré-exposição aos diferentes sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) em mulheres grávidas expostas ao ZIKV, cujos neonatos desenvolveram ou não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.383

quadros de distúrbios neurológicos e microcefalia, através de testes sorológicos e RT-qPCR;
 Determinar a associação entre pré-exposição a DENV e o agravamento do quadro de infecção por ZIKV, comparando aspectos sorológicos de pré-exposição da mãe com o fenótipo apresentado pela criança portadora de neurodistúrbio decorrente da infecção pelo vírus;
 Determinar a exposição (IgM) e pós-exposição (IgG) a DENV (1-4) e ZIKV em indivíduos pernambucanos;
 Avaliar o envolvimento da morte celular e da autofagia na patogênese da infecção por ZIKV em linhagens de células neuronais e placentárias;
 Investigar in vitro e in silico as vias de entrada do ZIKV em células gliais e o papel da maturação da partícula viral nestes mecanismos;
 Avaliar a contribuição da variabilidade genética do hospedeiro na susceptibilidade à infecção pelo ZIKV e ao dano neuronal, através de Estudos de Associação Ampla do Genoma (GWAS) e Estudos de Associação do Genoma Completo (WGAS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Dor no local da punção venosa para coleta da amostra, hematoma e tromboflebite.

Benefícios: Os voluntários serão informados quanto ao resultado de exame gerado pelo estudo que possa auxiliar o diagnóstico e tratamento.

O conhecimento de como o perfil imunológico e molecular dos indivíduos influencia na patogênese da infecção pelo ZIKV pode auxiliar na condução clínica, na identificação precoce de pacientes pré-dispostos a forma grave da doença, bem como no desenvolvimento de medidas de saúde pública adequadas e possíveis formas de tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

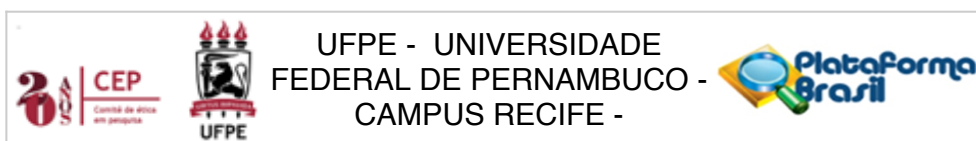
Trata-se de um estudo muito bem delineado, com objetivos claros e critérios de inclusão/exclusão bem definidos. Os documentos anexados estão redigidos de forma adequada. De acordo com os resultados obtidos o estudo poderá acrescentar conhecimento quanto aos fatores genéticos e moleculares envolvidos na patogênese da infecção por vírus Zika.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: Coleta de amostras com início previsto para o primeiro trimestre de 2019 e encerramento no último trimestre 2019;

Orçamento: R\$ 1.255.012,00 referente a equipamentos, KITS laboratoriais, passagens, bolsas e

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.383

diárias, adequadamente explicitados. O projeto recebe financiamentos provenientes do CNPq (440371/2016-3) e da Capes (88881.130808/2016-01), totalizando R\$ 1.232.800,00 (um milhão duzentos e trinta e dois mil e oitocentos reais).

TCLE redigido de forma adequada

Folha de Rosto preenchida de forma adequada;

Curriculum vitae dos pesquisadores anexados;

Cartas de anuência do Hospital Mestre Vitalino, LIKA e Circulo do Coração de Pernambuco CirCor anexadas;

Termo de confidencialidade anexado.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

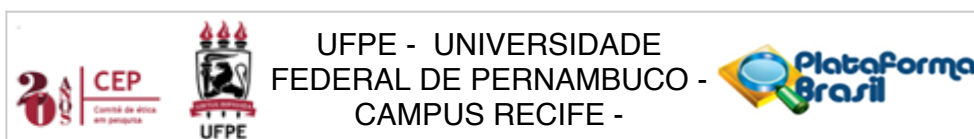
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



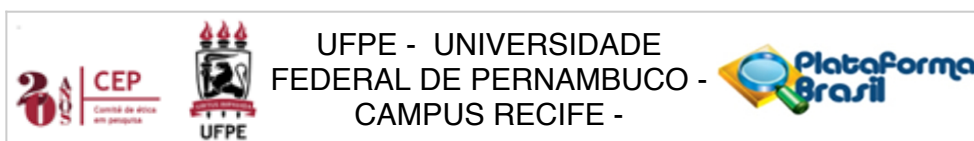
Continuação do Parecer: 3.135.383

curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1253788.pdf	20/11/2018 12:30:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoZIKVSubmissaoCEP7nov2018.docx	20/11/2018 12:15:15	Almerinda Agreli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TLCEMaiores.docx	20/11/2018 12:12:51	Almerinda Agreli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TLCEMenor.docx	20/11/2018 12:12:43	Almerinda Agreli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TLCEResponsavel.docx	20/11/2018 12:12:28	Almerinda Agreli	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	07/11/2018 23:22:13	Almerinda Agreli	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	07/11/2018 23:21:11	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeAssinado.pdf	07/11/2018 23:19:40	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoDeUsoDeDadosAssinadaCarimbada.pdf	07/11/2018 23:17:22	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciaMestreVitalino.pdf	07/11/2018 23:15:53	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_SandraMattos1.pdf	07/11/2018 23:15:29	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração do Patrocinador	ComprovanteFinanciamentoCNPqCAPITALeCUSTEIO.pdf	07/11/2018 23:12:31	Almerinda Agreli	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.135.383

Declaração do Patrocinador	ComprovanteFinanciamentoCapesCUST EIO.pdf	07/11/2018 23:12:22	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração do Patrocinador	ComprovanteFinanciamentoCapesBOLS AS.pdf	07/11/2018 23:12:12	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CurriculoNatalia.pdf	07/11/2018 23:10:59	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CV_HEITOR.pdf	07/11/2018 23:10:44	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CurriculoHeverton.pdf	07/11/2018 23:10:01	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CVRonald.pdf	07/11/2018 23:09:44	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Brandao_Lattes.pdf	07/11/2018 23:09:30	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Crovella_Lattes.pdf	07/11/2018 23:08:57	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CV_Agreli_Almerinda.pdf	07/11/2018 23:07:51	Almerinda Agreli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciaLikaAssinadaCarimbada.pdf	07/11/2018 23:01:18	Almerinda Agreli	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinadaCarimbada.pdf	07/11/2018 22:59:27	Almerinda Agreli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 07 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br