



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LUCAS COELHO BERNARDO

**INTERAÇÕES BIOMOLECULARES DO VÍRUS ZIKA EM
PROCESSOS PATOLÓGICOS DE MORTE CELULAR**

Recife

2021

LUCAS COELHO BERNARDO

**INTERAÇÕES BIOMOLECULARES DO VÍRUS ZIKA EM PROCESSOS
PATOLÓGICOS DE MORTE CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial na obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Co-orientadores:

Dr^a. Almerinda Agrelli

Dr. Ronald Rodrigues de Moura

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Bernardo, Lucas Côelho

Interações biomoleculares do vírus Zica em processos patológicos de morte celular /
Lucas Côelho Bernardo– 2021.

180 f.: il., fig., tab.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão

Coorientadores: Almerinda Agrelli e Ronald Rodrigues de Moura

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Vírus da Zica 2. Glicoproteínas 3. Ácido ribonucleico I. Brandão,
Lucas André Cavalcanti (orient.) II. Agrelli, Almerinda (coorient.) III.
Moura, Ronald Rodrigues de (coorient.) IV. Título

616.925

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-301

LUCAS COELHO BERNARDO

**INTERAÇÕES BIOMOLECULARES DO VÍRUS ZIKA EM PROCESSOS
PATOLÓGICOS DE MORTE CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências, Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial na obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

APROVADO EM: 26/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão
Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Membro interno da banca examinadora
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Elisa de Almeida Neves Azevedo
Membro externo da banca examinadora
Instituto Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Camilla Albertina Dantas de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

*À toda comunidade LGBTQ+ que, assim como eu,
luta para (sobre)viver de ciência.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, sou extremamente grato ao querido orientador Lucas Brandão, ao qual me aceitou orientar ao longo desses 24 meses com muito esforço, dedicação e carinho. Acredito que nem todas e todos têm a oportunidade de serem orientados por alguém que sempre se dispôs a atender dúvidas e mostrar novas chances para crescer profissionalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit/SCTIE/MS pelo apoio financeiro para execução do projeto. Em especial a CAPES pelo suporte financeiro, o qual me permitiu morar e me manter em outro estado para estudar.

Agradeço também à Almerinda Agrelli e Ronald Moura pelo prazer de ser apoiado e questionado nessa pesquisa, como co-orientadores, tanto quanto pela mais sincera amizade que foi criada pela vida. Além disso, sou muito agradecido a todas e todos que compõem ou passaram pelo nosso grupo de pesquisa, em especial Ana Sofia, Neyla Alves, Beatriz Calado, Isabela Arruda, Natália Silva, Giovanna Bloise, Bruno Rodrigo, João Paulo Brito e demais. Agradeço ainda ao colaborador Professor Lindomar Pena e sua equipe pela parceria formada, bem como, ao Professor Fabrício Souto com sua expertise, em que ambos contribuíram para a inicialização e finalização deste estudo.

Obrigado aos demais amigos e colegas que criei ou que fortifiquei laços de carinho, conselhos e convivência, especialmente para Carla Macêdo, Victor Ventura, Louise Fernandes, Cleanne Limeira, Nathália Galvão, Caroline Targino, Adalberto Filho, Cláudio Monteiro, Eryck Holmes, Yasmin Bernardo, entre outros tantos.

Sou grato aos componentes da banca examinadora que se dispuseram a ler e agregar seus conhecimentos a este trabalho.

Aos mais sinceros agradecimentos aos familiares e parentes, em especial minha avó Walquíria Coêlho pelos variados ensinamentos.

Na vida, não existe nada a se temer, apenas a se compreendido.

(Marie Curie)

RESUMO

As glicoproteínas E e M do vírus Zika (ZIKV) participam da infectividade na célula hospedeira por meio da ancoragem aos receptores de superfície celulares e fusão entre membranas. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a interação dessas proteínas do ZIKV com receptores celulares utilizados, por esse vírus, para ligação e/ou entrada na célula-alvo humana. Receptores do TNF tipo 1 (TNFR1), TNF tipo 2 (TNFR2) e Fas destacam-se entre os principais membros nessa família de proteínas transmembrana pela modulação completa da via extrínseca de apoptose. Nesse trabalho, o objetivo foi analisar as interações biomoleculares *in silico* e *in vitro* na relação vírus-célula, avaliando a influência do ZIKV em processos patológicos de morte celular. As análises *in silico* foram baseadas em estruturas proteicas presentes banco de dados RSCB *Protein Data Bank* (PDB). Predições de *docking* tipo proteína-proteína foram realizadas pelo servidor *ClusPro* e a dinâmica molecular foi realizada por meio do *software* GROMACS. Para as análises *in vitro*, foram utilizadas as linhagens de células VERO e neuroblastoma humano (SH-SY5Y) para expansão viral da cepa do ZIKV pernambucana e ensaios de morte celular. As células SH-SY5Y foram submetidas a tratamentos com estimulante/inibidor do processo autofágico (Rapamicina®, Cloroquina® ou SBI-0206965®) e incubadas por 0, 24 ou 48 horas. A partir do sobrenadante, foram isolados o RNA de ZIKV e o quantitativo celular dividido em duas amostras para serem realizadas as análises de morte celular para análises de citometria de fluxo. A comparação quantitativa foi realizada por meio da ANOVA *two-way*. Aqui, a proteína M do ZIKV demonstrou forte afinidade de ligação e formação de interações com os receptores Fas e TNFR2. Além disso, apenas o grupo com Cloroquina® exibiu aumento significativo no quantitativo viral em relação a tempo e autofagia. Nosso trabalho sugere que a proteína M do ZIKV seja um fator de fixação para ancoragem em Fas e TNFR2, bem como, a autofagia atenuada na infecção por ZIKV leva a morte celular neuronal.

Palavras-chave: Ciclo de replicação; Ligações de hidrogênio; Macroautofagia; Proteínas estruturais; RNA viral.

ABSTRACT

Glycoproteins E e M of the Zika virus (ZIKV) participate in infectivity of the host cell through anchoring to cell surface receptors and fusion among membranes. However, little is known about the interaction of these ZIKV proteins with the receptors used by this virus for binding and/or entry in human cells. TNF type 1 (TNFR1), TNF type 2 (TNFR2) and Fas receptors are main members in family of transmembrane proteins due to the complete modulation of the extrinsic pathway of apoptosis. In this work, objective was to analyze the biomolecular interactions *in silico* and *in vitro* of the virus-cell relationship, evaluating the influence of ZIKV in cell death pathological processes. The silico analyzes were based on protein structures present in the RSCB Protein Data Bank (PDB) database. Protein-protein predictions were performed by the ClusPro server and molecular dynamics were performed using the GROMACS software. For in vitro analyzes, VERO cell lines and human neuroblastoma (SH-SY5Y) were used for viral expansion of the Pernambuco ZIKV strain and cell death assays. SH-SY5Y cells were subjected to treatments with a stimulant/inhibitor of the autophagic process (Rapamycin®, Chloroquine® or SBI-0206965®) and incubated for 0, 24 or 48 hours. From the supernatant, the ZIKV RNA and the cell quantity divided in two were obtained, to be performed as cell death analyzes for flow cytometry analyzes. Quantitative comparison was performed using two-way ANOVA. Here, the ZIKV protein M includes strong binding affinity and formation of interactions with the Fas and TNFR2 receptors. In addition, only the group with Chloroquine® exhibited a significant increase in viral quantity in relation to time and autophagy. Our work suggests that the ZIKV M protein may be an attachment factor for anchoring on Fas and TNFR2, as well as, an attenuated autophagy in the ZIKV infection leads to neuronal cell death.

Keywords: Replication cycle; Hydrogen bonds; Macroautophagy; Structural proteins; Viral RNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Barreiras moleculares e celulares no corpo de mosquitos vetores infectados por arboviroses	20
Figura 2 -	Representação tridimensional em crio-microscopia eletrônica da superfície de partículas virais de um isolado de <i>Flavivirus</i> sp.	22
Figura 3 -	Organização genômica em <i>Flavivirus</i> spp., com representação das regiões não-codificantes (UTR) e sequência aberta de leitura (ORF) em 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-3'....	23
Figura 4 -	Esquema geral das etapas do ciclo de replicação viral (internalização, fusão, translação, replicação de RNA, montagem, maturação e secreção) de <i>Flavivirus</i> spp. em células eucarióticas	24
Figura 5 -	Modelo representativo da partícula madura do vírus da Zika (ZIKV)	25
Figura 6 -	Árvore filogenética das sequências do genoma do vírus Zika (ZIKV) por genótipo viral (Africano ou Asiático), país de origem e ano do isolado	27
Figura 7 -	Estrutura dos N-acetilglicosamina que influenciam na ligação da glicoproteína E dos <i>Flavivirus</i> com receptores DC-SIGN e L-SIGN de macrófagos e dendríticas	28
Figura 8 -	Esquema representativo da etapa de maturação até a secreção de vírions do vírus Zika (ZIKV) em diferentes ambientes intracelulares com mudança de pH	29
Figura 9 -	Complexo das proteínas estruturais Envelope (E) e Membrana (M) do vírus Zika (ZIKV)	31
Figura 10 -	Representação da proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus Zika (ZIKV)	32
Figura 11 -	Tropismo do vírus Zika (ZIKV) em diferentes tipos celulares e tecidos de mamíferos	36
Figura 12 -	Mapa global das infecções do vírus Zika (ZIKV)	41
Figura 13 -	Panorama geral dos sintomas, período de infecção e diagnóstico de indicação para pacientes suspeitos de vírus Zika (ZIKV)	44
Figura 14 -	Via intrínseca de apoptose em células eucarióticas. Estímulos apoptóticos causam ativação da BH3-only da família de proteínas linfoma de células B tipo 2 (BCL-2)	50

Figura 15 -	Sinalização apoptótica via Fas/FasL. Engajamento dos receptores de morte (DRs) com seus ligantes cognatos, como FasL/CD95L, promovendo recrutamento e ativação das proteases iniciadoras de apoptose, com Caspase-8 ativando BH3, que recruta proteínas pro-apoptóticas na mitocôndria, e Caspase-3, para formar substratos apoptóticos e finalizar o mecanismo de apoptose	51
Figura 16 -	Formação dos complexos TNFR1-TNF- α e TNFR2-TNF- α . Ambos TNFR1/2 são caracterizados por domínios ricos em cisteína (CRD) em sua parte extracelular	52
Figura 17 -	Visão geral da sinalização em TNFR1/2. A ativação do TNFR1 induz a formação do complexo I que consiste em moléculas adaptadoras como TRADD, RIPK1, TRAF2 e E3 ubiquitina ligases cIAP1/2	53
Figura 18 -	Tipos principais de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas e microautofagia endossômica tardia	55
Figura 19 -	Base molecular da via macroautofágica	56
Figura 20 -	Panorama do desenho experimental no tratamento celular para infectividade viral	64
Figura 21 -	Etapas do processo de extração do RNA viral oriundas de amostras do sobrenadante de células infectadas e não infectadas	65
Figura 22 -	Validação de modelagem da proteína prM do vírus Zika (ZIKV)	67
Figura 23 -	Complexos proteicos formado por predições de <i>docking</i> molecular entre ligantes endógenos (FasL, TNF- α) ou proteína M do vírus Zika com os receptores de TNF (Fas, TNFR1, TNFR2)	69
Figura 24 -	Ligações de hidrogênio semelhantes formadas nos complexos TNFR2-TNF- α e TNFR2-M	71
Figura 25 -	Plots das simulações em dinâmica molecular entre os complexos Fas-FasL, cor preta, e Fas-M, cor vermelha	72
Figura 26 -	Plots das simulações em dinâmica molecular entre os complexos TNFR1-TNF- α , cor preta, e TNFR1-M, cor vermelha	73
Figura 27 -	Plots das simulações em dinâmica molecular entre os complexos TNFR2-TNF- α , cor preta, e TNFR1-M, cor vermelha	74
Figura 28 -	Células infectadas dos grupos tratados com Rapamicina® e marcadas para fenômenos de autofagia (LC3 e P62) e apoptose (Anexina V e 7AAD) independente de tempo, lidas por Citrometria de Fluxo e gráficos gerados pelo FlowJo	78

Figura 29 -	Box plot com valores estatísticos em Log 10 de cópias virais do vírus Zika, por microlitro, para cada grupo de células infectadas tratadas de acordo com marcadores de apoptose e autofagia	79
Figura 30 -	Células do grupo PBS[CHL] em 00 ou 24 horas pós-infecção (hpi), lidas por Citometria de Fluxo e gráficos gerados pelo FlowJo	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das arboviroses emergentes transmitidas por mosquitos vetores	19
Tabela 2 -	Tamanho, peso molecular e função na biogênese viral das proteínas estruturais e não-estruturais (NS) expressas pelo genoma do vírus Zika	26
Tabela 3 -	Cronologia dos maiores casos do vírus Zika (ZIKV) por região, com descrição das principais manifestações clínicas e a genótipo viral do surto de 2007 à 2016	40
Tabela 4 -	Métodos sorológicos disponíveis, suas indicações e aplicabilidades para diagnóstico do vírus Zika	45
Tabela 5 -	Primers de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) usados para detecção de RNA de ZIKV em diferentes países onde ocorreram surtos	47
Tabela 6 -	Caracterização das proteínas selecionadas no banco de dados <i>Protein Data Bank</i> (PDB)	59
Tabela 7 -	Valores de <i>scores</i> gerados por <i>docking</i> dos receptores de TNF (FAS, TNFR1, TNFR2) com seus ligantes endógenos (FasL, TNF- α) ou com proteínas do vírus Zika (E-M, E, M, prM, pr, NS1)	68
Tabela 8 -	Descrição das interações por ligações de hidrogênio nos complexos proteicos (Fas-M, TNFR1-M, TNFR2-M) por cadeias das proteínas, resíduos de aminoácidos e distância das ligações formadas	70
Tabela 9 -	Valor médio da carga viral (cópias/ μ L), quando infectadas com MOI de 0,1 do vírus Zika, por diferentes grupos de tratamentos em 00, 24 ou 48 horas pós-infecção	75
Tabela 10 -	Visão geral do teste paramétrico com múltiplas comparações (x1- hpi; x2- presença/ausência de vírus; x3- mediana do quantitativo celular) para fenômeno de autofagia	76
Tabela 11 -	Visão geral do teste paramétrico com múltiplas comparações (x1- hpi; x2- presença/ausência de vírus; x3- mediana do quantitativo celular) para fenômeno de apoptose	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+ssRNA	Fita simples sentido positivo de RNA
7-AAD	7-Amino-Actinomicina
ALA	Alanina
AMPK	Proteína quinase ativadora-AMP
Ap2	Adaptador heterotetramérico
APAF1	Fator 1 de ativação da peptidase apoptótica
ARG	Arginina
ASP	Asparagina
ATF6	Fator ativador de transcrição 6
ATG	Proteínas relacionadas à autofagia
AV	Anexina V
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
C	Capsídeo
CALM	Proteínas de leucemia mieloide de montagem de Clatrina
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CHIKV	Vírus da chinkungunya
cIAP1/2	Proteína 1/2 inibidora celular de apoptose
CRD	Domínio Rico em Cisteína
CYS	Cisteína
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Vírus da dengue
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Envelope
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
E-stem	Domínio haste da proteína E
E-TM	Domínio transmembrana da proteína E
EUA	Estados Unidos da América
FADD	Proteína associada a Fas com domínio de morte
GLN	Glutamina

GLU	Glutamina
GLY	Glicina
HIS	Histidina
hpi	Horas pós-infecção
HSPG	Glicosaminoglicano
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IRE1	Enzima exigindo-inositol 1
JEV	Vírus da encefalite Japonesa
LC3	Cadeia leve 3B das proteínas 1A/B associadas aos microtúbulos
LEU	Leucina
LINCS	<i>Linear Coonstraint Solver</i>
LYS	Lisina
M	Membrana
MAYV	Vírus mayaro
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
M-TM	Domínio transmembrana da proteína M
mTOR	Proteína quinases serina-treonina alvo de rapamicina
NF- κ B	Fator de necrose tumoral κ B
NPT	Número de partícula constante, pressão e temperatura
ns	Nanossegundos
NS	Proteína não-estrutural
NVT	Número de partículas constante, volume e temperatura
ORF	Sequência aberta de leitura
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PERK	Proteína quinase RNA-tipo quinase do retículo endoplasmático
PHE	Fenilalanina
PME	<i>Particle Mesh Edwald</i>
PRO	Prolina
PS	Fosfatidilserina
ps	Picossegundos
RE	Retículo Endoplasmático
RMSD	Desvio médio dos átomos
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SASA	Superfície de acessibilidade do solvente
SBF	Soro Bovino Fetal
SCZ	Síndrome Congênita de Zika
SER	Serina
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma humano
SNC	Sistema Nervoso Central
THR	Treonina
TIM	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain protein</i>
TNFR1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral tipo 1
TNFR2	Receptor do Fator de Necrose Tumoral tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRADD	Domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TRAF1	Fator 1 associado ao receptor TNF
TRAF2	Fator 2 associado ao receptor de TNF
TRAF5	Fator 5 associado ao receptor de TNF
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UTR	Regiões não-codificantes
VAL	Valina
VERO	Células renais de macaco verde africano
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	ARBOVIROSES, MOSQUITOS VETORES E SAÚDE PÚBLICA	19
2.2	VISÃO GERAL DE <i>FLAVIVIRIDAE</i>	21
2.2.1	Flaviviroses	22
2.3	Vírus Zika	24
2.3.1	Partícula maturada	24
2.3.2	Etapas do ciclo de replicação	27
2.3.3	Estrutura, função e patógenos das proteínas virais	30
2.3.3.1	Proteínas estruturais	30
2.3.3.2	Proteínas não-estruturais	31
2.3.4	Variantes genéticas em cepas circulantes	33
2.3.5	Permissibilidade celular	35
2.3.6	Persistência tecidual	37
2.3.7	Efeitos citopáticos e tecidos neurais infectados	38
2.3.8	Características epidemiológicas e manifestações clínicas	39
2.3.9	Métodos de diagnóstico	43
2.3.10	Opções de tratamento	46
2.3.11	Microcefalia congênita e guillain-barré associados as infecções	48
2.4	PROCESSOS PATOLÓGICOS DE MORTE CELULAR	48
2.4.1	Mecanismos de apoptose	48
2.4.2	Vias de autofagia	53
3	OBJETIVOS	58
3.1	GERAL	58
3.2	ESPECÍFICOS	58
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	ENSAIOS <i>IN SILICO</i>	59
4.1.1	Banco de dados	59
4.1.2	Modelagem molecular	59
4.1.3	<i>Docking</i> molecular	60
4.1.4	Dinâmica molecular	60
4.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	61

4.2.1	Cultivo, expansão e armazenamento das células	61
4.2.2	Expansão viral do isolado ZIKV PE243	62
4.2.3	Titulação viral	62
4.2.4	Tratamento celular para infectividade viral	63
4.2.5	Quantificação do RNA viral	64
4.2.6	Avaliação de apoptose e autofagia	65
4.2.7	Análise estatística	66
5	RESULTADOS	67
5.1	AVALIAÇÃO <i>IN SÍLICO</i>	67
5.2	ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	75
6	DISCUSSÃO	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE A – In Vitro Zika Vírus Infection Of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays	97
	APÊNDICE B - <i>In Silico</i> Evaluation Of Zika Virus Strutural Proteins E And M With TNF Receptors	110
	ANEXO A – Docking Molecular	111
	ANEXO B – Interações Moleculares	152
	ANEXO C – Análises Estatísticas	172

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus emergente que apresenta um padrão de infectividade e ciclo de replicação semelhante aos demais representantes do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Sabe-se que ZIKV pode ser transmitido para humanos por mosquitos-vetores hematófagos, principalmente *Aedes aegypti*, e também já foram reportadas transmissões por vias sexual e materno-fetal (JAVED et al., 2017).

A partir dos anos 2000, surtos de ZIKV iniciaram em regiões do Sudeste da Ásia e posteriormente, aumentou de proporção em taxas de infectados a partir do Pacífico Sul até causar grandes casos nas Américas. A rota nas infecções por ZIKV gerou potencial histórico epidemiológico de grande impacto em países localizados geograficamente de regiões tropicais e subtropicais. Acredita-se que, por *Aedes* spp. ser um vetor cosmopolita, sua ampla distribuição talvez tenha contribuído inicialmente na disseminação e taxa de transmissibilidade de ZIKV em países tropicais como Malásia, Polinésia Francesa, Brasil e Colômbia (CHANG et al., 2016).

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de epidemia no cenário da saúde pública a nível internacional devido ao crescente número em casos de indivíduos infectados e associação da infecção de ZIKV com síndromes, tais como malformações congênitas e doenças autoimunes neurológicas. Atualmente, a Síndrome Congênita de Zika (SCZ) refere-se ao conjunto de sinais e sintomas em neonatos diagnosticados com anomalias congênitas neurológicas ou anatômicas, associados a infecção por ZIKV. Enquanto que em adultos, foi visto uma forte indicação de pacientes infectados que desenvolveram Síndrome de Guillain-Barré (SGB), logo após a epidemia de ZIKV (WHO, 2016).

No envelope de ZIKV, as glicoproteínas E e M participam da infectividade na célula hospedeira por meio da ancoragem aos receptores de superfície celulares e fusão entre membranas, respectivamente (AGRELLI et al., 2019). DC-SIGN, L-SIGN, Tyro3, Axl e TIM-1 são alguns dos receptores mais bem relatados na entrada de ZIKV em células dendríticas, endoteliais, gliais e epidermais (LEE et al., 2018; AGRELLI et al., 2019). Entretanto, ainda pouco se sabe da interação de ZIKV com outros tipos de receptores celulares, utilizados para ligação e/ou entrada na célula-alvo.

A família de receptores de TNF são bem conhecidos por estarem envolvidos em vias inflamatórias, morte celular, controle de homeostase e resposta contra patógenos. Receptores de TNF tipo 1 (TNFR1), TNF tipo 2 (TNFR2) e Fas destacam-se entre os principais membros nessa família de proteínas transmembrana pela modulação completa da via extrínseca de

apoptose, independente da p53. TNFR1/2 compartilham a citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) como agonista endógeno, enquanto que, Fas é ativado pelo ligante de Fas (FasL). TNFR1, TNFR2 e Fas estão expressos comumente na superfície de células do sistema imune (macrófagos e linfócitos) e não-imunes (epiteliais e fibroblastos) (ASHKENASI, 2002). Até o momento, permanece desconhecido sobre a biologia e interação desses receptores em infecções virais.

Estudos vem demonstrando a capacidade de isolados do genótipo Asiático de ZIKV interagir com diferentes tipos celulares e provocar danos à célula infectada. Parada do ciclo celular (LIU et al., 2018), modulação da expressão de genes (LIANG et al., 2016) e morte celular (LIU et al., 2018) têm sido alguns dos efeitos citopáticos por ZIKV em células neurais. Então, compreender esses efeitos citopáticos podem levar a maiores estudos com capacidade de correlacionar e elucidar mecanismos fisiopatológicos a condições clínicas de pacientes infectados por ZIKV que apresentam sintomas graves, tais como SCZ e SGB.

Nos últimos anos, os esforços da comunidade científica têm sido voltados em pesquisas de controle biológico do vetor e prevenção de epidemias causadas por arboviroses. Na patogênese das infecções por ZIKV, ainda há muitas dúvidas a serem esclarecidas na tentativa de elucidar mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia das manifestações clínicas graves. Nesse contexto, ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo* continuam sendo utilizados com cultivo celular afim de reproduzir condições semelhantes à infecção de ZIKV em células hospedeiras. Recentemente, análises *in silico* ganharam espaço na pesquisa científica utilizando simulações computacionais com finalidade de demonstrar predições biomoleculares na afinidade de patógenos por componentes celulares.

Nesse trabalho, o objetivo foi analisar as interações biomoleculares *in silico* e *in vitro* na relação vírus-célula, avaliando a influência de ZIKV em processos patológicos de morte celular. Aqui, partimos das hipóteses que: (1) as proteínas de ZIKV apresentam capacidade de interagir com receptores de TNF da célula hospedeira, talvez desencadeando fenômenos intracelulares, e (2) o ciclo replicação viral é favorecido por meio de processos patológicos autofágicos, aumentando o quantitativo de vírions durante a fase inicial, provavelmente ativando apoptose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARBOVIROSES, MOSQUITOS VETORES E SAÚDE PÚBLICA

Arbovírus é um termo sem valor taxonômico, derivado do inglês *arthropode borne viruses*, que representa um grupo de vírus de RNA com alta heterogeneidade transmitidos por artrópodes hematófagos, por um ciclo biológico complexo de transmissão entre vírus, vetor e hospedeiro vertebrado. Maior parte dos arbovírus são patógenos emergentes e causaram surtos epidemiológicos mundialmente conhecidos, tais como membros de *Flavivirus*, dentre esses, vírus da febre amarela (YFV), Nilo Ocidental (WNV), encefalite japonesa (JEV), dengue (DENV) e Zika (ZIKV). Outros vírus representantes da família *Togoviridae*, do gênero *Alphavirus*, como vírus da chinkungunya (CHIKV) e do mayaro (MAYV) também se destacam entre arboviroses transmitidas por mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* (Tabela 1). Porcos, aves, primatas não-humanos e humanos foram descritos entre hospedeiros infectados, até o momento, e como reservatórios para arboviroses por meio de ciclos zoonóticos com transmissão vertical destes mosquitos vetores (HUANG et al., 2014; HIGUERA; RAMIREZ, 2018; WEGER-LUCARELLIM et al., 2018).

Tabela 1 – Relação das arboviroses emergentes transmitidas por mosquitos vetores

Família	Gênero	Vírus	Principais vetores
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	YFV	<i>Aedes</i> spp.
		WNV	<i>Culex</i> spp.
		JEV	<i>Culex</i> spp.
		DENV	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
		ZIKV	<i>Aedes</i> spp.
<i>Togoviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	CHIKV	<i>Ae. Aegypti</i>
		MAYV	<i>Ae. Aegypti</i>

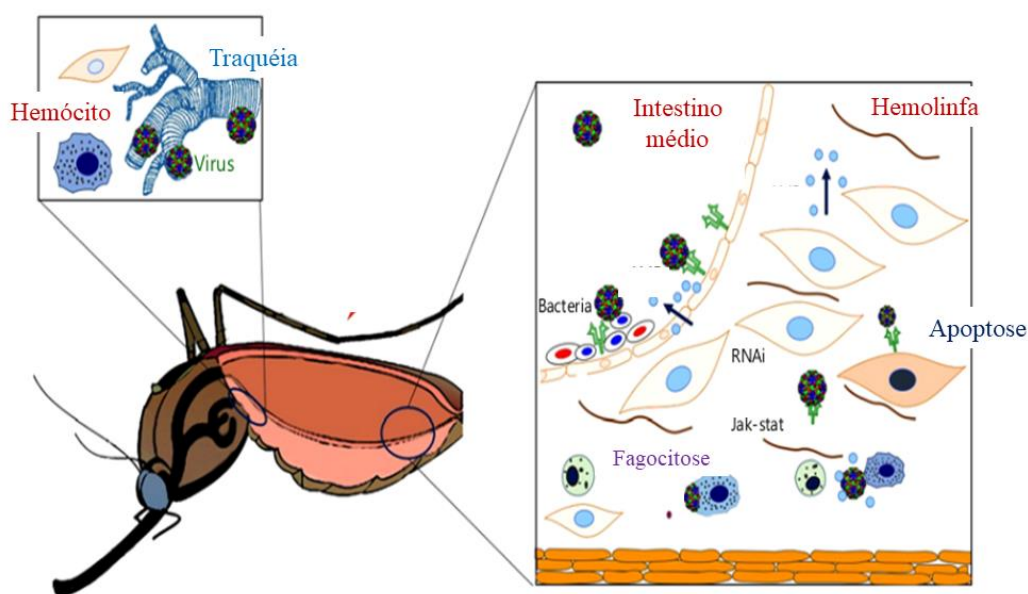
YFV= vírus da febre amarela; WNV= vírus do Nilo Ocidental; JEV= vírus da encefalite japonesa; DENV= vírus da Dengue; ZIKV= vírus da Zika; CHIKV= vírus da Chinkungunya; MAYV= vírus mayaro. Fonte: Adaptada (YANG-JANG et al., 2014; HIGUERA; RAMIREZ, 2018; WEGER-LUCARELLIM et al., 2018).

Aedes e *Culex* spp. são mosquitos antropofílicos que demonstram ampla distribuição geográfica por continentes com áreas tropicais e subtropicais. Além disso, fatores ambientais também podem influenciar na habilidade do vetor torna-se competente na transmissão e aumentar a viremia, tais como clima, temperatura e disponibilidade de hospedeiros na região. Apenas as fêmeas destes mosquitos hematófagos, quando infectadas, tem capacidade de transmitir verticalmente no momento que regurgita saliva com partícula virais na área lesada,

após ter alimentando-se do hospedeiro. A transmissão transovariana também é possível de ocorrer entre mosquitos vetores fêmeas de arboviroses, infectando os progenitores da geração seguinte (HUANG; HIGGS; VA, 2019).

Nesse contexto, a interação vírus-vetor é determinante no potencial epidêmico, pois abrange barreiras físicas e celulares no corpo do invertebrado durante a infectividade para efetuar o ciclo de replicação viral. Os arbovírus alcançam o lúmen do intestino médio, ultrapassam a microbiota intestinal rica em fungos e bactérias do vetor, penetram células epiteliais e ativam respostas antivirais intracelulares. Após infectar fagócitos e circular dentro de hemócitos, as novas partículas virais alcançam as glândulas salivares das traqueias respiratórias dos artrópodes (Figura 1). Por fim, os arbovírus completam sucesso no ciclo biológico de transmissão quando são secretados na saliva no momento de hematofagia do inseto (ALONSO-PALOMARES et al., 2019).

Figura 1 – Barreiras moleculares e celulares no corpo de mosquitos vetores infectados por arboviroses



Os arbovírus alcançam o lúmen do intestino médio, ultrapassam o microbioma intestinal rica em fungos e bactérias do vetor, penetram as células epiteliais e ativam respostas antivirais por RNA de interferência (RNAi), receptores intracelulares via Toll e moléculas da JAK-STAT. Fonte: Adaptada (ALONSO-PALOMARES et al., 2019).

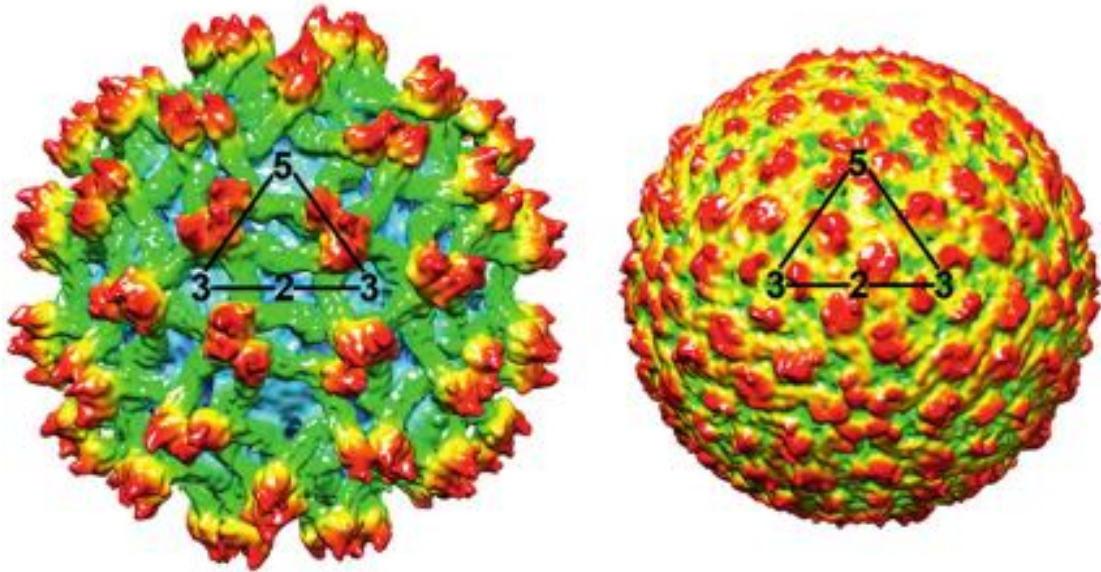
Entre os anos de 2016 e 2017, a taxa de transmissão de CHIKV, DENV e ZIKV por mosquitos *A. aegypti* foi maior em 36 países ao longo da América Central até América do Sul (LIMA-CAMARA, 2016). O impacto na saúde pública tem sido constante em países como o Brasil, que investem recursos federais em projetos que visam combater o vetor, cobrindo despesas médicas e tratamentos de pacientes infectados que desenvolveram as formas mais

graves de doenças associadas aos arbovírus. No ano de 2016, estima-se que foram gastos cerca de R\$ 1,5 bilhão somente no combate ao vetor. Além disso, o custeio direto na saúde para serviços médicos e hospitalares atingiu a marca de R\$ 374 milhões. Doenças associadas a CHIKV e ZIKV apresentaram os maiores índices para o indicador de vida ajustada por incapacidade, chegando a gastos aproximados de R\$ 431 milhões. Em geral, todos os custos do governo brasileiro na época obtiveram um impacto no valor de R\$ 2,3 bilhões, onde os estados mais gastaram foram São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia. No estado de Pernambuco, no mesmo ano, cerca de R\$ 55 milhões foram gastos no setor da saúde para todos os casos de arboviroses registrados e de R\$ 128 milhões para gastos totais (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2018).

2.2 VISÃO GERAL DE *FLAVIVIRIDAE*

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV, 2020), a família *Flaviviridae* apresentam quatro gêneros taxonômicos, até agora, com pouco mais de 60 espécies. Dentre eles, compreendem-se *Pestivirus* (11 espécies), *Pegivirus* (11 espécies), *Hepacivirus* (14 espécies) e *Flavivirus* (53 espécies). Nesta família compreendem-se vírus com características de infectividade principalmente para mamíferos, com alguns membros das espécies de *Flavivirus*, são também encontrados em vetores artrópodes. Quanto ao vírion, são comumente esféricos, com 40-60 nm de diâmetro, cobertos por uma membrana lipídica, com duas ou três glicoproteínas, que protegem o nucleocapsídeo viral (Figura 1). O genoma dos representantes da *Flaviviridae* apresenta tamanho que varia de 9 à 13 kb, sendo uma fita simples sentido positivo de RNA (+ssRNA) e não-segmentada (SIMONDS et al., 2017).

Figura 2 – Representação tridimensional em crio-microscopia eletrônica da superfície de partículas virais de um isolado de *Flavivirus* sp.



A partícula viral madura está à esquerda em 12,5 Å de resolução e a partícula imatura, em 10 Å, à direita. As formas triangulares apresentam os eixos de simetria de uma única unidade icosaédrica.

Fonte: Adaptada (SIMONDS et al., 2017).

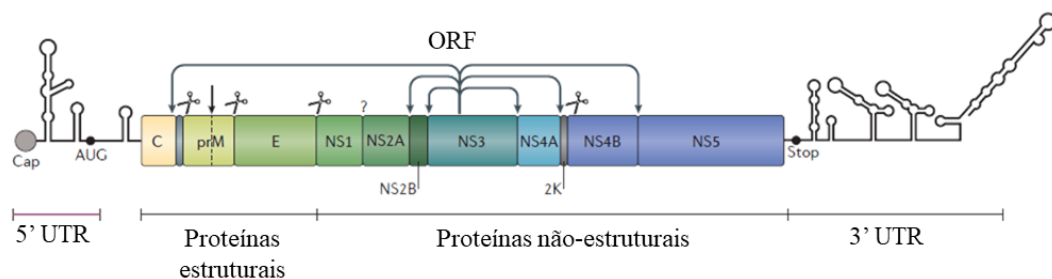
Os gêneros *Flavivírus* e *Hepacivírus* destacam-se entre demais representantes da *Flaviviridae* por abranger os maiores números de espécies e de valiosa importância na patogênese em humanos. Dentre *Flavivírus* spp., os principais representantes são as arboviroses YFV, WNV, JEV, DENV e ZIKV. Enquanto que para *Hepacivírus* spp., vírus Hepatite C (HCV) demonstra ser o principal representante devido a sua alta virulência. Ambas *Flavivírus* spp. e *Hepacivírus* spp. compartilham propriedades virológicas semelhantes, como ciclo de replicação e organização do genoma poliprotéico, que expressam dez proteínas virais (NEUFELDT et al., 2018).

2.2.1 Flaviviroses

+ssRNA de *Flavivírus* spp. apresenta cerca de 10-11 kb em tamanho de genoma viral, subdividida por regiões não-codificantes (UTR) e uma sequência aberta de leitura (ORF) (NG et al., 2017; NEUFELDT et al., 2018). As UTR estão localizadas tanto na extremidade 5' e no terminal 3' da fita +ssRNA, com nucleotídeos metilados para transdução celular canônica e não-poliadenilado formando uma estrutura de loop, respectivamente (NG et al., 2017). 5' UTR e 3' UTR possuem função essencial no momento de replicação, auxiliando na expressão do genoma viral com informação de leitura de “início”, pela estrutura tipo 1 de CAP AUG e,

“parada” na final do genoma. A ORF representa a parte da +ssRNA em que ocorre a expressão de dez proteínas na etapa de replicação da síntese viral, com três delas estruturais e sete não-estruturais (NS), dependentes da clivagem por peptidases da célula hospedeira, que atuam como “tesouras” no sinal celular, e de protease viral do próprio genoma de *Flavivírus* spp. (Figura 3) (NEUFELDT et al., 2018).

Figura 3 – Organização genômica em *Flavivírus* spp., com representação das regiões não-codificantes (UTR) e sequência aberta de leitura (ORF) em 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-3'

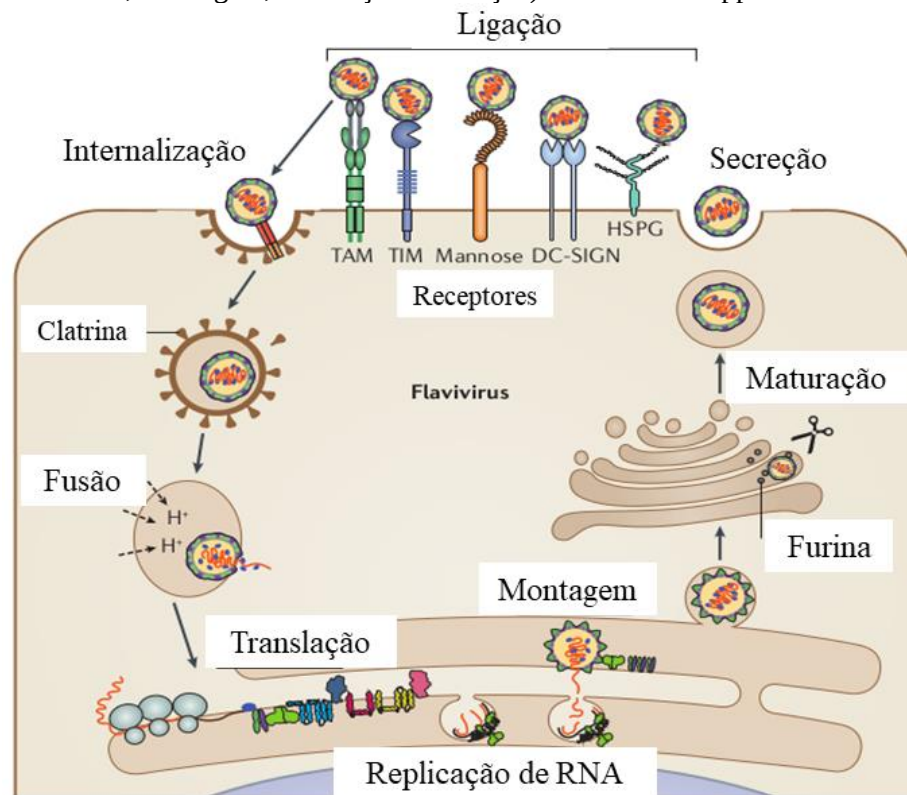


5' UTR é constituído pelo tipo 1 de CAP AUG, e 3' UTR, sequência de “parada”. Ambas 5' UTR e 3' UTR marcam o início e o final do genoma viral. A ORF é capaz de expressar as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus inicialmente como uma fita poliproteica. No ciclo de replicação de *Flavivírus* spp., peptidases virais e da célula hospedeira assumem função de “tesouras” clivando a sequência da poliproteína. Fonte: Adaptada (NEUFELDT et al., 2018).

Na síntese viral em *Flavivirus* spp., as etapas do ciclo de replicação são semelhantes ao de outros vírus envelopados. As proteínas estruturais Envelope (E), Membrana (M) e Capsídeo (C), respectivamente, mantém a estabilidade da partícula livre, protegendo o material genético viral e permitindo a ancoragem em superfície de células eucarióticas. A internalização da partícula viral ocorre por endocitose mediado via clatrina, com reconhecimento de receptores de superfície celular. Receptores da família TAM (Tyro3, Axl, Mertk) e *T cell immunoglobulin and mucin domain protein* (TIM-1, -3, -4) tem capacidade de reconhecer a fosfatidilserina do envelope viral. Outros receptores, como glicosaminoglicano (HSPG) e da família lectina do tipo C, receptor de Manose e *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN), podem interagir por alta afinidade com resíduos de carboidratos e reconhecer N-acetilglicosaminas na glicoproteína E. Em seguida, ocorre fusão do nucleocapsídeo as membranas endossomais, devido ao baixo pH da vesícula, e liberação de seu material genético no citoplasma. Assim, ribossomos livres reconhecem a +ssRNA e iniciam a tradução no retículo endoplasmático (RE), quando é produzida uma só poliproteína que sofre clivagem de proteases celulares e virais (NS2B-NS3). As novas proteínas NS auxiliam na

síntese de RNA (NS5), reorganizando a membrana (NS4A, NS4B) do RE e recrutando mais NS2B-NS3 para ampliar a replicação. Ao mesmo tempo, as proteínas NS1 e NS2A realizam a montagem de novos vírions para serem translocados em vesículas ao Aparato de Golgi. Na maturação, a furina cliva a porção pr da proteína estrutural prM em M, fenômeno que converte uma partícula viral imatura em maturada. Por fim, várias cópias das partículas virais são compactadas em vesículas exocíticas e secretadas ao meio extracelular, como mostrado na Figura 4 (NEUFELDT et al., 2018).

Figura 4 – Esquema geral das etapas do ciclo de replicação viral (internalização, fusão, translação, replicação de RNA, montagem, maturação e secreção) de *Flavivirus* spp. em células eucarióticas



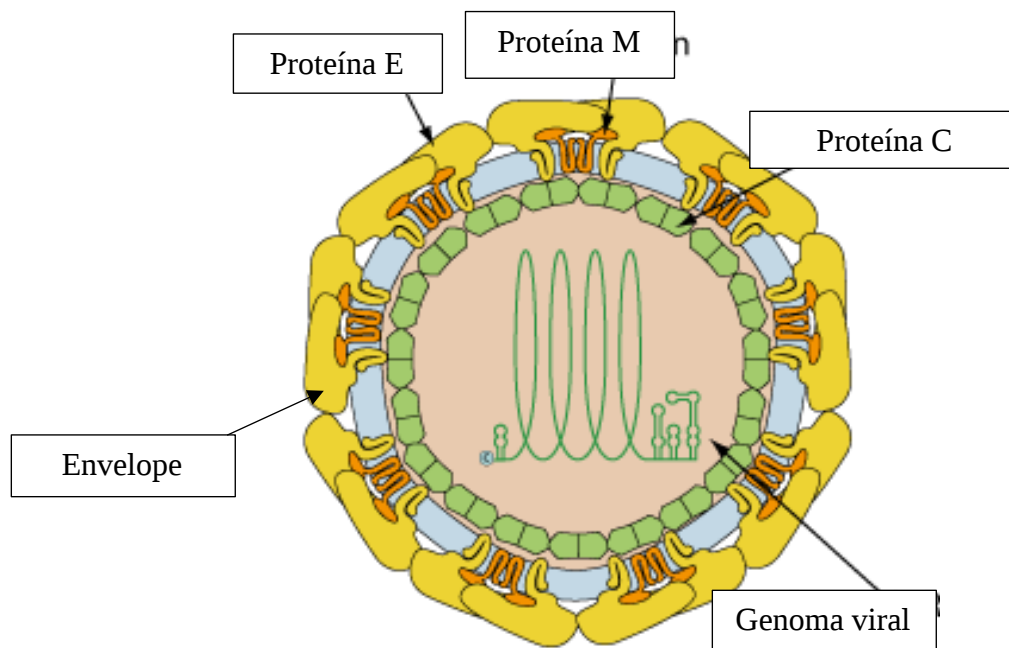
Inicialmente, ocorre o contato da partícula maturada do vírus por ligação à receptores de superfície celular (TAM, TIM, receptor de manose, DC-SIGN e HSPG) para então, a célula realizar endocitose. Em seguida, o vírus é internalizado via clatrina e depois fusionado a vesículas endossomais da célula hospedeira. A translação ocorre no Retículo Endoplasmático, quando ribossomos livres reconhecem o RNA viral e acoplam a membrana externa dessa organela. Então, é iniciada a síntese do RNA viral e com auxílio das proteínas estruturais e não-estruturais, a nova partícula viral é montada e secretada para o Complexo de Golgi. A proteína estrutural prM da partícula imatura sofre ação da enzima proteolítica furina, marcando a maturação para ser secretada por exocitose ao meio extracelular. Fonte: Adaptada (NEUFELDT et al., 2018).

2.3 VÍRUS ZIKA

2.3.1 Partícula maturada

Na morfologia, ZIKV apresenta 50 nm de diâmetro, envelope glicoprotéico e nucleocapsídeo disposto de forma icosaédrica. A composição da partícula madura é determinada pela presença de proteínas estruturais encontradas no envelope (E e M), as quais auxiliam na adesão e fusão do vírus na célula hospedeira. Além disso, o nucleocapsídeo é formado pelo capsídeo, composto pela proteína C, somado ao material genético viral (Figura 5) (JAVED et al., 2017; SHAILY; UPADHYA, 2019).

Figura 5 – Modelo representativo da partícula madura do vírus da Zika (ZIKV)



A camada mais externa representa o envelope com as glicoproteínas E e M ancoradas na bicamada lipídica do ZIKV. O nucleocapsídeo apresenta a camada interna viral formada pelo capsídeo icosaédrico protegendo seu material genético. Fonte: Adaptada (VIRALZONE, 2016).

Sabe-se que na +ssRNA de ZIKV contém 10.794 pares de base em comprimento que expressam uma única poliproteína com 3.423 aminoácidos e geram as proteínas E, prM, C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Além disso, essas proteínas virais apresentam funções específicas essenciais na síntese viral e variações na quantidade de aminoácidos e posição dos seus resíduos dependendo do genótipo viral (Tabela 2) (JAVED et al., 2017; SHAILY; UPADHYA, 2019).

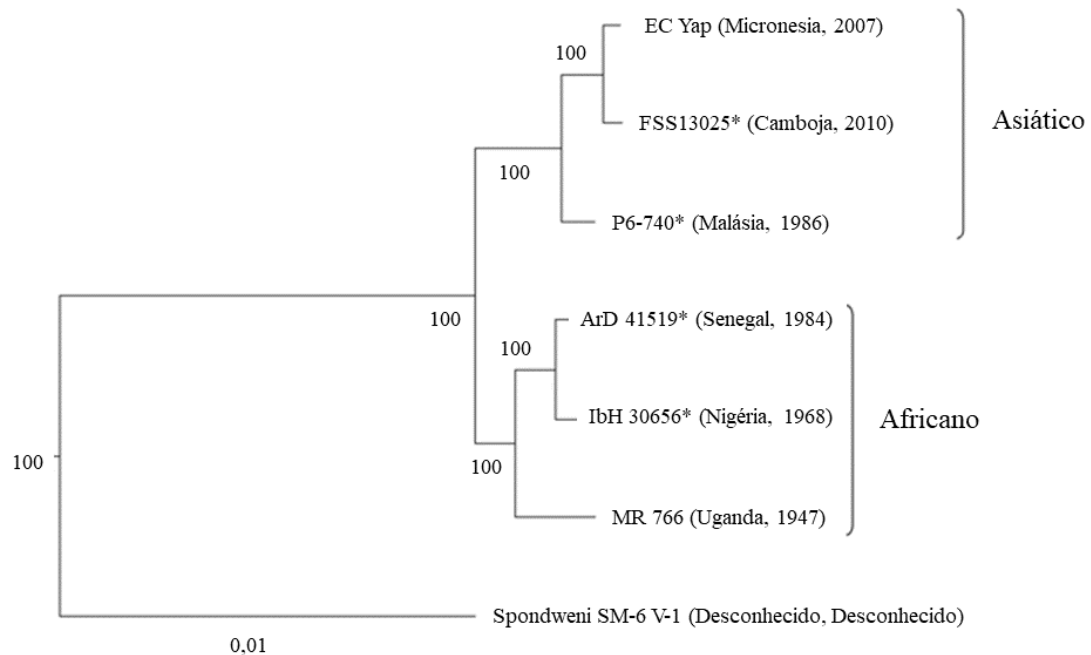
Tabela 2 – Tamanho, peso molecular e função na biogênese viral das proteínas estruturais e não-estruturais (NS) expressas pelo genoma do vírus Zika

Proteínas	Tamanho (aa)		Peso molecular (kDa)	Funções
	Africano	Asiático		
E	500	504	54	Adesão, fusão e entrada;
prM	178	168	19	Percursora da proteína M;
C	122	122	14	Forma o nucleocapsídeo;
NS1	384	352	40	Replicação do genoma;
NS2A	226	226	24	Replicação do genoma e montagem da partícula viral;
NS2B	130	130	14	Cofator para NS3 na atividade protease;
NS3	617	617	69	Atividades enzimáticas de serino-protease, helicase e trifosfatase;
NS4A	127	127	14	Replicação e montagem do vírion;
NS4B	252	251	27	Replicação e montagem do vírion;
NS5	902	903	103	Atividade metiltransferase, RNA polimerase, replicação e calda poli-A;

Fonte: Adaptada (HOU et al., 2017; JAVED et al., 2017; SHAILY; UPADHYA, 2019).

Até agora, foram identificados dois grandes genótipos de ZIKV e são subdivididos em linhagens, dentre eles, os genótipos Africano (África Oriental e Ocidental) e Asiático (Sudoeste Asiático, Pacífico e Americano) (KAWAI et al., 2019). De acordo com análises filogenéticas, MR 766 Uganda é considerada a cepa mais basal da árvore evolutiva e ancestral comum as demais, Senegal e Nigéria. Na linhagem Asiática, as cepas mais recentes de ZIKV do Camboja e Micronésia apresentam sequências de aminoácidos derivados da cepa predominante da Malásia (Figura 6) (HADDOW et al., 2020).

Figura 6 – Árvore filogenética das sequências do genoma do vírus Zika (ZIKV) por genótipo viral (Africano ou Asiático), país de origem e ano do isolado



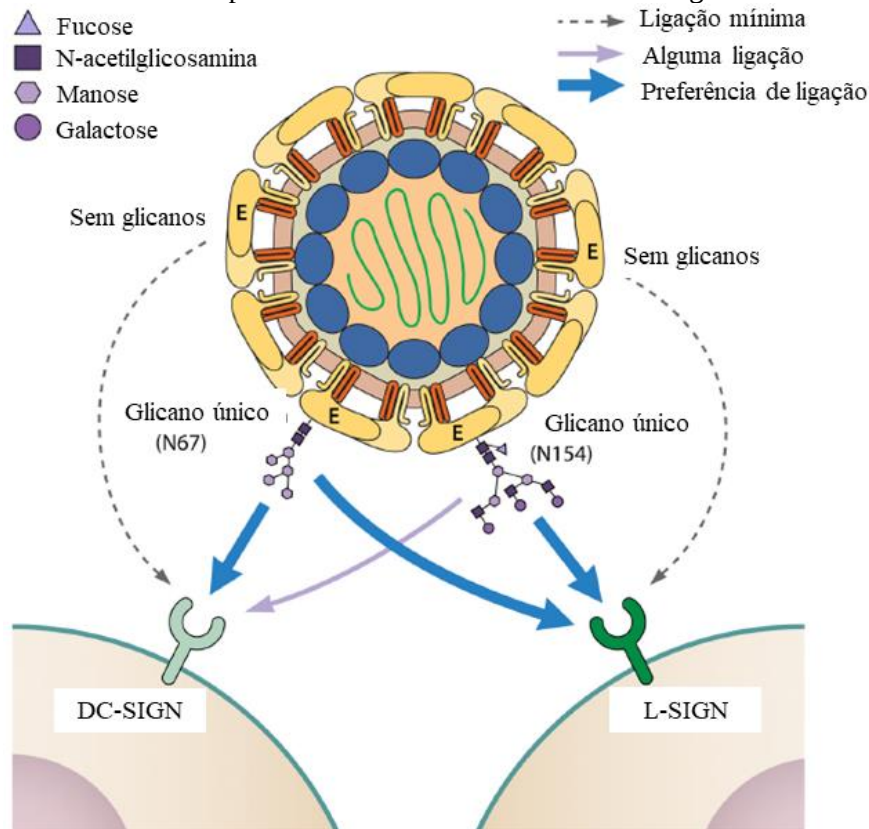
Filogenia gerada do alinhamento da região de leitura aberta da sequência dos isolados. Cada nó representa um percentual da distância genética dos locais de substituição dos nucleotídeos por valores baseados em 1.000 replicatas. Fonte: Adaptada (HADDOW et al., 2020).

2.3.2 Etapas do ciclo de replicação

A primeira etapa é quando o ZIKV se liga à célula hospedeira de várias maneiras (AGRELLI et al, 2019). Os meios de entrada são: (1) reconhecimento de receptores de superfície celular e (2) internalização via clássica de endocitose mediada por Clatrina.

DC-SIGN e L-SIGN são os principais receptores de superfície de lectinas do tipo-C envolvidos e descritos capazes de reconhecer carboidratos da porção N-acetilglicosamina, ligados ao resíduo N154 da proteína E de ZIKV (Figura 7). Em geral, DC-SIGN está abundante em células de mamíferos, dentre elas, macrófagos e dendríticas, enquanto que L-SIGN é expresso por células endoteliais da microvasculatura (CARBAUGH; LAZEAR, 2020). Por outro lado, ZIKV também pode usar receptores que reconhecem a PS da partícula viral para penetrar a célula-alvo, principalmente por Axl e TIM-1. Ambas as famílias TAM e TIM são amplamente distribuídas em células da placenta, neuronais e endoteliais (AGRELLI et al., 2019).

Figura 7 – Estrutura dos N-acetilglicosaminas que influenciam na ligação da glicoproteína E dos *Flavivirus* com receptores DC-SIGN e L-SIGN de macrófagos e dendríticas



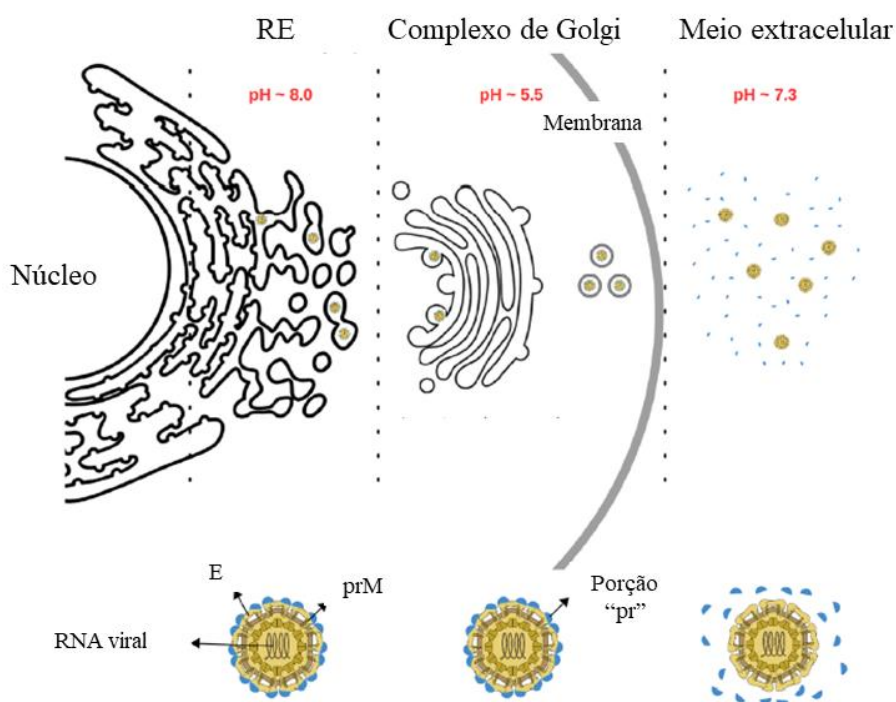
A proteína E apresenta glicosilação apenas no resíduo N154, podendo ser reconhecido fortemente por L-SIGN e com menor preferência por DC-SIGN. Fonte: Adaptada (CARBAUGH; LAZEAR, 2020).

A endocitose mediada via Clatrina desempenha um papel como um sensor da célula hospedeira eucariótica contra WNV, DENV e ZIKV (HACKETT; CHERRY, 2018). Inicialmente, o revestimento de Clatrina é composto pelo adaptador heterotetramérico (Ap2) e proteínas de leucemia mieloide de montagem de Clatrina (CALM). Então, Ap2 e CALM interagem com os filamentos de actina formando andaimes precursores que desencadeiam os eventos endocíticos (KAKSONEN; ROUX, 2018). No ZIKV, o processo de entrada via Clatrina, é muito bem conservado entre os genótipos Africanos e Asiáticos (RINKENBERGER; SCHOGGINS, 2019).

Uma vez dentro da célula, o baixo pH dentro do endossomo permite o estado nativo da proteína E, fundindo-se à membrana do endossomo e liberando o RNA viral no citoplasma (AGRELLI et al., 2019; GRATTON et al., 2019). Em seguida, para a replicação de RNA e tradução de proteínas virais, o processo de montagem da partícula viral começa na parte externa da membrana do RE (MOHD ROPIDI et al., 2020). As partículas recém-montadas normalmente encontradas na membrana interna do RE entram no RE e adquirem PS. A partir daí, as partículas virais migram dos endossomos para o complexo de Golgi, onde ocorre o

processo de maturação viral. O processo de maturação ocorre através da proteína hospedeira furina que quebra a proteína prM na porção "pr" e M (Figura 8). Finalmente, as novas partículas virais maduras do ZIKV são liberadas no ambiente extracelular com a capacidade de infectar outras células ao redor (GRATTON et al., 2019; AGRELLI et al., 2019). Enquanto isso, a síntese do ZIKV pode causar efeitos citopáticos nas células e tecidos neurais.

Figura 8 – Esquema representativo da etapa de maturação até a secreção de vírions do vírus Zika (ZIKV) em diferentes ambientes intracelulares com mudança de pH



ZIKV é transportado do retículo endoplasmático (RE), com pH básico, até o Complexo de Golgi. No ambiente ácido do Golgi, a proteína prM é convertida em proteína M pela ação da furina, marcando a maturação viral. Via exocitose, vírions e partículas do peptídeo “pr” são secretados ao meio extracelular. Fonte: Adaptada (OLIVEIRA et al., 2017).

Durante as etapas síntese viral, as células hospedeiras podem demonstrar alterações morfológicas e moleculares em resposta à infecção viral (SOUSA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2018). Os efeitos citopáticos são consequências da replicação do ZIKV, que provoca o acúmulo de componentes virais (LIU et al., 2019). O espaço citoplasmático (LI et al., 2017) e organelas (GARCIA et al., 2020) são os principais alvos das proteínas virais. Na reorganização das membranas RE, a replicação do ZIKV causa um estresse no RE, que resulta na ativação de duas vias intracelulares: *Unfolded Protein Response* (UPR) e processos autofágicos (TAN et al., 2018). UPR inicia cascatas de sinalização nas membranas RE e sua amplificação leva a

autofagia em resposta ao acúmulo de proteínas virais (GRATTON et al., 2019), ambos são mecanismos que comprometem a homeostase da célula infectada.

2.3.3 Estrutura, função e patógenes das proteínas virais

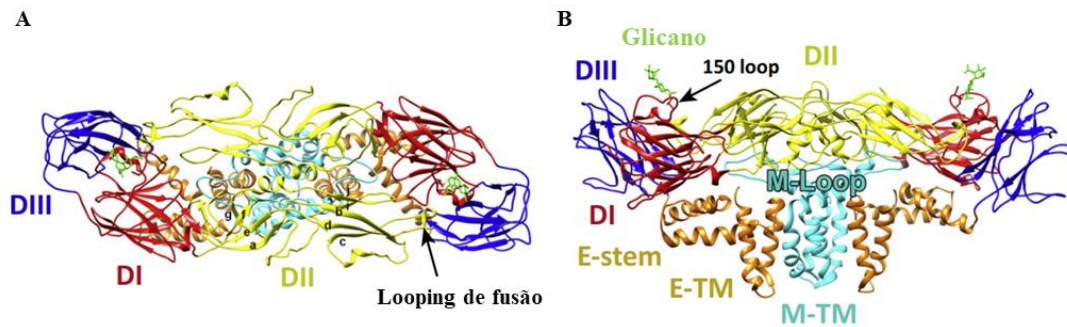
Em geral, ZIKV apresenta uma estrutura bem definida com a partícula viral composta por proteínas estruturais. Além disso, as proteínas NS apresentam diferentes funções no ciclo de replicação viral. Entretanto, ambas as proteínas estruturais e NS demonstram estar envolvidas na patogênese de ZIKV.

2.3.3.1 Proteínas estruturais

A proteína E, derivada do nome envelope, é a maior e mais bem conhecida das glicoproteínas antigênicas entre membros de *Flavivírus*, pois apresenta função primordial de adesão, reconhecimento e fusão a célula hospedeira. Na estrutura dimérica da proteína E é encontrada um domínio, exclusivamente de ancoragem a membranas, um grande domínio com duas regiões, denominadas de haste (E-stem) e transmembrana (E-TM), outros três domínios estruturais conhecidos por DI, DII e DIII (BARROWS et al., 2018), de acordo com a Figura 7A. Sabe-se que o DI apresenta função estrutural servindo como ponte de ligação e sustentação química aos outros domínios. DII assume papel na interagir e promover a fusão na membrana celular por meio de uma estrutura em forma de alça em *loop*, localizada na alça de sustentação com DI. Enquanto que, DIII é conhecido como domínio semelhante a imunoglobulina, com capacidade de se ligar aos receptores de superfície extracelular e sua alça de ligação ao DI possui rigidez em pH neutro (KOSTYUCHENKO et al., 2016). Além disso, na proteína E de ZIKV também é possível observar glicosilação no resíduo de asparagina da posição 154 (Asn154 ou N154), o qual pode estar associado à sua virulência. Esse padrão de N-glicosilação é aparentemente conservado entre flavivíroses. Em DENV, a glicosilação também é demonstrada no resíduo Asn67 (CARBAUGH; LAZEAR, 2020).

Ainda no envelope, fusionada em dímeros a proteína E, encontra-se a proteína M, que recebeu esse nome por estar localizada na membrana viral (Figura 7B). Na partícula viral madura, a proteína M é resultado de uma clivagem da proteína prM, gerando a proteína M e a porção “pr”, por proteases celulares, na etapa de maturação do ciclo de replicação viral (AGRELLI et al., 2019). A porção “pr” ainda continua sem provável destino dentro da célula hospedeira, mas, acredita-se que seja secretada junto aos vírions no fim do ciclo de replicação (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, permanece desconhecido outras interações que a “pr” livre possa realizar.

Figura 9 – Complexo das proteínas estruturais Envelope (E) e Membrana (M) do vírus Zika (ZIKV)



(A) Dímero da proteína E com um domínio transmembrana de haste (E-TM), em laranja, e mais três ectodomínios (DI – vermelho, DII – amarelo, DIII – azul), com um *looping* de fusão. (B) Proteína M com domínio transmembrana (M-TM) fusionada a proteína E, com M-TM e E-TM imersos na membrana. Fonte: Adaptada (SHI; GAO, 2017).

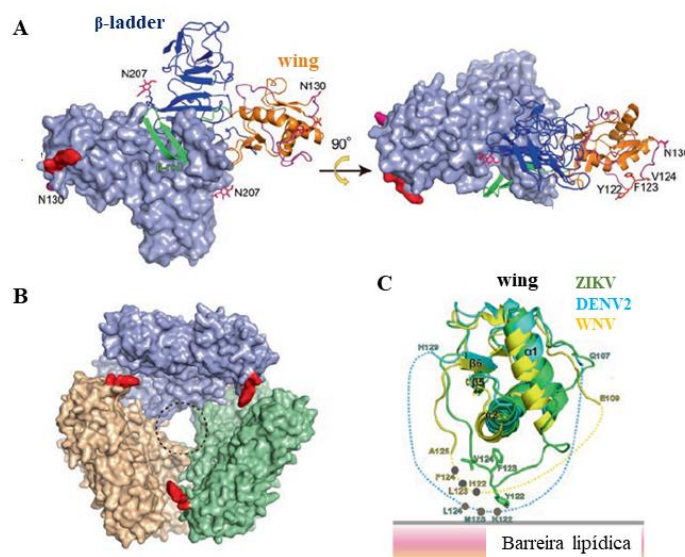
Juntas, as proteínas E e M na partícula formam a camada mais externa acima da bicamada lipídica da partícula maturada de ZIKV. Abaixo dessa bicamada viral, o nucleossídeo é formado exclusivamente por dímeros da proteína C, que compõem o capsídeo viral, protegendo o núcleo com genoma de RNA. Até o momento, sabe-se que a função da proteína C é somente estrutural para o vírus. Mas durante as etapas do ciclo de replicação, a proteína C é recrutada no RE da célula hospedeira para compor a partícula imatura de ZIKV. Alguns relatos apontam que a proteína C poderia estar envolvida na ativação de apoptose em modelos *in vitro* (SHAILY; UPADHYA, 2019).

2.3.3.2 Proteínas não-estruturais

NS1 destaca-se como uma das principais proteínas auxiliares envolvidas na etapa de replicação do genoma viral. Pode ser encontrada em vesículas intracelulares, no meio citoplasmático ou exocitada no meio extracelular em forma de partícula hexamérica lipoproteica. NS1 demonstra potencial de evadir do sistema imunológico tanto inato quanto adaptativo, bem como, apresenta como um grande marcador antigênico nas infecções pelo ZIKV, DENV e WNV. Entretanto, no ZIKV ainda pouco conhece sobre quais outros mecanismos imunopatogênicos a NS1 poderia estar envolvida. Assim como a NS1 de DENV e WNV, do ZIKV demonstra arranjos e dobras com domínios proteicos em cada monômero denominados de β -hairpin (resíduo 1-30), wing (resíduo 31-181) e β -ladder (182-352) (Figura 8). Em geral, os domínios β -hairpin e β -ladder representam, respectivamente, as regiões N- e C-terminal da NS1, enquanto que o domínio wing representa a região central da proteína. Na NS1 de Flaviviruses, N-glicosilação é muito bem conservada nos resíduos N130 e N207.

Ademais, NS1 apresenta duas faces com propriedades, uma hidrofóbica e outra hidrofílica, o que poderia indicar interações com membranas (SHI et al., 2018).

Figura 10 – Representação da proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus Zika (ZIKV)



(A) NS1 na forma dímero, aonde cada monómero apresenta três domínios: *β*-hairpin, *wing* e *β*-ladder. Os resíduos N130 e N207 representam as N-glicosilações da NS1. (B) NS1 em forma de hexâmero e a região central apresenta propriedade hidrofóbica. (C) Modelo comparativo do domínio *wing* da NS1 de ZIKV com vírus da Dengue tipo 2 (DENV2) e vírus do Nilo Ocidental (WNV), ancorados a barreira lipídica. Fonte: Adaptada (SHI et al., 2018).

As proteínas NS2A e NS2B apresentam estruturas diferenciadas e multifuncionalidades. NS2A demonstra uma porção hidrofóbica que permanece imersa a membrana do RE, após a síntese proteica viral. A principal função da NS2A é descrita como auxiliadora da replicação do RNA, ligando-se a região 3'-UTR com outras regiões da +ssRNA. Entretanto, NS2A vem sendo apontada também como supressora da resposta imune e bloqueadora da secreção celular de partículas virais (JAVED et al., 2017). NS2B torna-se um cofator enzimático do domínio protease da NS3, compondo o complexo NS2A-NS3 com atividade serina protease com função principal de clivagem da poliproteína, sendo esse o sinal inicial para etapa de replicação do RNA (XING et al., 2019).

NS3 é uma das proteínas com mais quantidade de domínios na sua estrutura proteica, com região C-terminal assumindo atividades enzimáticas de trifosfatase e helicase do RNA, bem como, um domínio protease complementar a NS2B. Enquanto que a região N-terminal está associada com síntese e complementação do RNA viral, bem como, assume funcionalidade em desenrolar regiões mal-formadas (JAVED et al., 2017).

NS4A e NS4B atuam como mediadoras da etapa de replicação do RNA (JAVED et al., 2017) e permanecem sublocalizadas entre as membranas do RE no ciclo de replicação (LI et al., 2017). Além disso, NS4A e NS4B podem contribuir como graves fatores moleculares da patogênese viral do ZIKV por inibir vias de autofagia (LIANG et al., 2016; SHAILY; UPADHYA, 2019). Semelhante ao WNV, no momento da clivagem da sequência NS4A-2K-NS4B da poliproteína, o peptídeo 2K atua como um sinal para translocação da NS4B para dentro do lúmen do RE, enquanto que NS4A permanece imersa ao espaço intermembranar (MERTENS et al., 2010).

Por fim, a proteína NS5 representa a maior, em tamanho por aminoácidos, e mais pesada, com multifuncionalidade no ciclo de replicação viral. A região N-terminal da NS5 representa um domínio com atividade metiltransferase, enquanto que a C-terminal é capaz de realizar a função de polimerase do RNA. Além disso, NS5 também atua diretamente sobre a replicação do genoma viral como um maquinário de proteção contra danos ao +ssRNA e promove a síntese da calda poli(A). Sobre a patogênese envolvida, NS5 é capaz de suprimir a resposta imunológica da célula hospedeira e degradar fatores de transcrição para genes de Interferon, tais como STAT2 (JAVED et al., 2017; SHAILY; UPADHYA, 2019).

2.3.4 Variantes genéticas em cepas circulantes

O ZIKV foi descoberto há 70 anos e muitas mudanças relacionadas à sua genética permanecem desconhecidas. Por que o genótipo asiático do ZIKV causou mais surtos do que o genótipo africano do ZIKV. Nesse contexto, os estudos de filogenia ajudam a elucidar a variabilidade genética nos genótipos virais, bem como sua similaridade (YE et al., 2016; SHIVRASTAVA et al., 2018).

Estudos de análise filogenética indicam que existem variações entre os aminoácidos em todo o genoma do ZIKV. Shivrastava et al (2018) observaram diversidade filogenética nos genótipos ZIKV africanos e asiáticos, bem como inserções/deleções em seu genoma viral. Barzilai e Schrago (2019) acreditam que a disseminação do ZIKV pode estar associada a mutações não sinônimas como resultado da taxa de evolução viral. Além disso, Strottmann et al. (2019) sugerem que algumas mutações não sinônimas devem ter um impacto na infectividade viral em células de mamíferos e de insetos.

De acordo com evidências sorológicas, isolamento viral e análises filogenéticas, a cepa asiática de ZIKV causou o surto na Malásia, nas ilhas do Pacífico e nas Américas (PETTERSSON et al., 2018). Em relação às sequências da região codificadora no genótipo asiático do ZIKV, Ye et al. (2016) e Faria et al. (2016) encontraram uma grande similaridade

genética entre as cepas do ZIKV das Ilhas do Pacífico e das Américas. No entanto, essas cepas de ZIKV exibiram uma distância filogenética de décadas em comparação com a cepa da Malásia. Além disso, a cepa ZIKV causou o surto na Malásia, em 1966, e foi identificada como uma cepa do sudeste asiático (FARIA et al, 2016). Além disso, Ye et al. (2016) sugerem que o genótipo asiático ZIKV demonstra um novo clado sendo constituído apenas por cepas americanas.

Os principais surtos de ZIKV foram causados pelo genótipo asiático do ZIKV (YE et al., 2016). O genótipo asiático do ZIKV é subdividido em cepas do sudeste asiático, ilhas do Pacífico e americanas. Kawai et al. (2019) avaliaram sua patogenicidade *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo, foi demonstrado que o ZIKV americano induziu a maior patogenicidade do que as outras duas cepas em ambos os modelos. Na verdade, variações no genoma viral podem ter algum impacto na célula hospedeira, bem como na patogenicidade viral (FARIA et al., 2016). Mutações não sinônimas foram encontradas em cepas de ZIKV da Micronésia, Polinésia Francesa e surtos no Brasil (AGRELLI et al., 2019). Enquanto isso, uma adaptação funcional pode aumentar a virulência do ZIKV refletindo nas infecções por ZIKV (YAN et al., 2017).

Usando uma abordagem *in silico*, mutações de impacto estrutural relevantes foram encontradas no domínio da helicase das proteínas C, NS2A e NS3 das cepas circulantes de ZIKV (AGRELLI et al., 2019). Por meio de modelos experimentais, outros estudos *in vitro* e/ou *in vivo* foram utilizados para elucidar mutações não sinônimas no genoma viral. Segundo Strottman et al. (2019), foram detectadas mutações nas proteínas E, NS1, NS2A, NS3 e NS4B de três isolados de ZIKV das regiões brasileiras. Além disso, Yuan et al. (2017) demonstraram que existe uma mutação S139N na proteína prM do genótipo asiático ZIKV e pode contribuir para SCZ. Esta mutação foi detectada antes do surto na Polinésia Francesa e permaneceu estabilizada durante a propagação do ZIKV até o surto nas Américas (YUAN et al., 2017). Na proteína NS4B, uma substituição da glutamina pelo aspartato E2587D foi observada durante o surto na China, em 2016, por uma cepa asiática de ZIKV (LI et al., 2017).

Muitos desses estudos sugerem que as cepas de ZIKV mudaram da Polinésia Francesa para as Américas e talvez tenha adquirido maior infectividade. Portanto, mutações nas proteínas virais reforçam duas teorias. Em primeiro lugar, mutações nas proteínas E, prM e C podem estar associadas a condições patológicas graves. Por exemplo, Li et al. (2019) indicam que as proteínas E e prM contribuem para a permissividade e infecciosidade do ZIKV nas células hospedeiras. Em segundo lugar, as mutações na proteína NS2A podem aumentar a replicação do ZIKV. Zhang et al. (2019) mostraram que a proteína NS2A tem a capacidade de recrutar

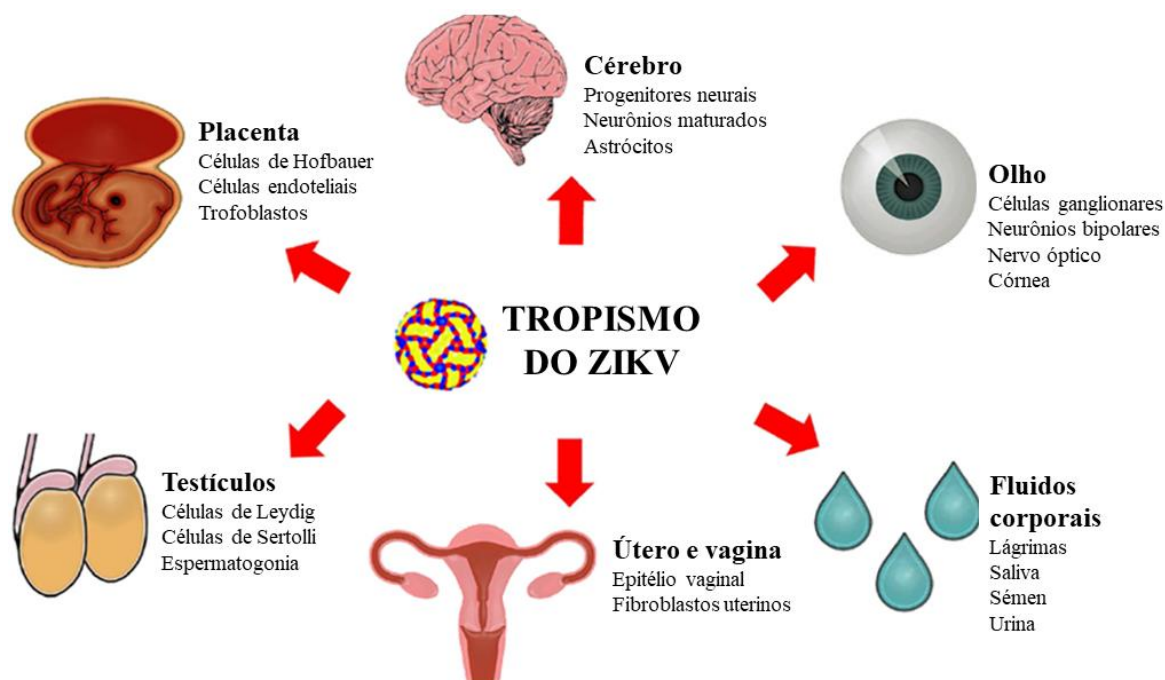
proteínas não processadas na clivagem em E-prM-C pela serina-protease NS2B/NS3, enquanto NS2A e NS4B atuam juntos para a montagem de novas partículas (LI et al., 2017).

2.3.5 Permissibilidade celular

O ZIKV é um patógeno que tem a capacidade de infectar diversos hospedeiros, variando desde mosquitos até mamíferos, além do tropismo por diversos tipos de células e tecidos (Figura 11). Células-tronco mesenquimais de rato, fibroblasto embrionário de camundongo, macrófago murino, rim de macaco e células de larva de mosquito são alguns dos modelos celulares não humanos que foram descritos como permissivos para a entrada, replicação e liberação de ZIKV (SILVA et al., 2019).

Entre as principais células humanas, o ZIKV pode infectar fibroblastos dérmicos (KIM et al., 2019), neurônios fetais (JORGACHEVSKI et al., 2019), Hofbauer primário (GAVEGNANO et al., 2017) e células-tronco mesenquimais (SILVA et al., 2019) epidérmicas queratinócitos (KIM et al., 2019), astrócitos corticais fetais (JORGACHEVSKI et al., 2019), trofoblastos primários (GAVEGNANO et al., 2017), células renais embrionárias (SILVA et al., 2019) e células germinativas (MATUSALI et al., 2018) . Além disso, alguns tipos de células imunes inatas também foram considerados permissivos, como monócitos primários (AYALA-NUNEZ et al., 2019) e células dendríticas plasmocitoides (ASSIL et al., 2019).

Figura 11 – Tropismo do vírus Zika (ZIKV) em diferentes tipos celulares e tecidos de mamíferos



ZIKV na placenta tem capacidade de infectar células de Hofbauer, trofoblastos e endoteliais. Células neuronais progenitoras, neurônios maturados e astrócitos são alvos no cérebro para o ZIKV. Dentre os tecidos do olho, córnea, neurosensores da retina e nervo óptico já foram reportados infectados pelo ZIKV. Assim como, ZIKV também já foi detectado em células e/ou tecidos dos testículos (Leydig, Sertoli e espermatogonia) e útero e vagina (epitélio vaginal e fibroblastos uterinos). Em fluidos corporais, ZIKV foi relatado principalmente em lágrimas, saliva, sêmen e urina. Fonte: Adaptada (MINTER; DIAMOND, 2017).

Estudos elucidaram a persistência das infecções por ZIKV em células da pele humana como uma abordagem para compreender a rota de infecção por picadas de mosquitos em hospedeiros mamíferos. Hamel et al. (2015) observaram *in vitro* que queratinócitos epidérmicos, fibroblastos dérmicos e células dendríticas imaturas eram permissivos para isolados de ZIKV da Polinésia Francesa. No entanto, Hou et al. (2017) verificaram que alguns fibroblastos e células de linhagem epidérmica têm baixas taxas de replicação ou permissividade zero de replicação de vírions. Além disso, as células da pele podem mediar uma resposta imune inata precoce durante as infecções por ZIKV (KIM et al., 2019).

De acordo com Hou et al. (2017), os genótipos do ZIKV africano e asiático não demonstraram qualquer diferença de permissividade nas células imunológicas. Sterlund et al. (2019) observaram algumas diferenças nas taxas de replicação entre o ZIKV africano e asiático, bem como que ambos os genótipos do ZIKV têm uma boa replicação em células dendríticas humanas. No entanto, apenas o ZIKV asiático teve taxas de replicação atenuadas dentro de macrófagos humanos (STERLUND et al., 2019), enquanto os mastócitos infectados com ZIKV mostraram ter maior entrada e replicação mais rápida em 30 min. Nesse contexto, dados de

Simonin et al. (2017) revisaram que o ZIKV africano tem mais virulência e maior patogenicidade, enquanto o ZIKV asiático é mais persistente.

2.3.6 Persistência tecidual

O ZIKV demonstra ter uma permissividade celular improvável, enquanto pode avançar para o nível do tecido. Durante as infecções pelo ZIKV no hospedeiro, algumas células podem se tornar reservatórios virais, contribuindo para a disseminação do ZIKV para os tecidos próximos. Foi observado *in vitro* que o ZIKV tem a capacidade de infectar células mononucleares do sangue periférico humano (HOU et al., 2017), indicando que essas células podem atuar presumivelmente como uma “porta de entrada” para sua propagação. Além disso, os monócitos infectados com ZIKV exibiram um processo de transmigração mais rápido do que um vírus livre de células nas barreiras endoteliais usando modelos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (AYALA-NUNEZ et al., 2019). Mastócitos infectados com ZIKV *in situ* também foram detectados circulando no tecido placentário de mulheres grávidas (RABELO et al., 2020).

Entre as vias de transmissão, o ZIKV também foi registrado como sendo transmitido por relações sexuais. Por exemplo, Almeida et al. (2020) observaram que o ZIKV tem a capacidade de infectar e persistir em espermatozoides, células somáticas e testiculares germinativas. Rashid et al. (2020) também observaram *in vitro* a infecção e replicação do ZIKV em células primárias de Sertolli humanas, o que mostra sua permissividade e persistência. Além disso, Matusali et al. (2018) demonstraram que o ZIKV infecta germes e células testiculares somáticas *in vitro*, bem como replica em testículos humanos *ex vivo* (MATUSALI et al., 2018). Pagani et al. (2017) demonstraram *in vitro* que a infecção pelo ZIKV pode ocorrer em células estromais endometriais primárias, assumindo-a como uma célula-alvo altamente permissiva. Relatos de Gavegnano et al. (2017) apontaram que as células humanas de Hofbauer e trofoblasto *in vitro* foram os hospedeiros competentes para a replicação do ZIKV.

Desde que a emergência de saúde pública foi declarada pela OMS, as infecções pelo ZIKV e as malformações congênitas estiveram fortemente associadas durante os surtos no Brasil (OMS, 2016). Células progenitoras neuronais e células gliais são os componentes essenciais na neurogênese. Disfunções das células do SNC durante os períodos gestacionais podem causar grandes impactos ao longo do desenvolvimento do cérebro neonatal (REEMST et al., 2016).

Li et al (2019) demonstraram por meio de modelos *in vitro* que, tanto o ZIKV africano quanto o ZIKV asiático, têm a capacidade de infectar e se replicar em neurônios e células gliais. Enquanto isso, Jorgačevski et al. (2019) reconheceram que ambos os genótipos do ZIKV tinham

mais neurotropismo por astrócitos fetais humanos do que por neurônios fetais humanos. Isso porque os astrócitos toleram maior carga viral das cepas de ZIKV de Uganda, Polinésia Francesa e Brasil (JORGACHEVSKI et al., 2019). E ainda, Goodfellow et al (2018) mostraram a redução da proliferação celular e da migração neuronal em células progenitoras neuronais como consequência da infecção pelo ZIKV asiático. Para modelos *in vivo*, Noguchi et al (2019) observaram que as cepas de ZIKV desenvolveram padrões semelhantes à neuropatologia grave. Ainda assim, Noguchi et al (2019) sugerem que a exposição ao ZIKV no primeiro trimestre ou posteriormente, durante os períodos de gestação, pode aumentar as chances de degeneração prolongada ou hipoplasia grave no SNC. A infecção por ZIKV também causou lesão tecidual por uma reação inflamatória e atividade fagocítica no tecido hipocampal (BUTTNOR et al., 2019). Enquanto Cugola et al. (2016) propõem que a cepa brasileira do ZIKV induz mecanismos de autofagia e apoptose que levam à morte celular em células progenitoras corticais.

Outros estudos avaliaram a correlação de casos de microcefalia e infecção por ZIKV. Por exemplo, Sousa et al. (2018) observaram *in situ* que as citocinas inflamatórias podem contribuir para lesões mais altas e apoptose na área do parênquima neural. Além disso, necrose, calcificação e infiltração de células mononucleares também foram associadas ao ZIKV em ensaios histopatológicos de neonatos com SCZ (AZEVEDO et al., 2018). Aguiar et al. (2020) encontraram mutações raras em genes hospedeiros do sistema imunológico a partir do cérebro de neonatos simples com SCZ, que podem estar associadas à suscetibilidade a infecções por ZIKV. Além disso, a proteína prM mostrou também mediar a virulência em células neuronais humanas (YAN et al., 2017; LI et al., 2019).

2.3.7 Efeitos citopáticos e tecidos neurais infectados

Durante a síntese do ZIKV, as células hospedeiras podem demonstrar alterações morfológicas e moleculares em resposta à infecção viral (SOUSA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2018). Os efeitos citopáticos são consequências da replicação do ZIKV, que provoca o acúmulo de componentes virais (LIU et al., 2019). O espaço citoplasmático (LI et al., 2017) e organela (GARCIA et al., 2020) são os principais alvos das proteínas virais. Durante a reorganização das membranas ER, a replicação do ZIKV causa estresse no ER, que resulta na ativação de duas vias intracelulares: resposta proteica não dobrada (UPR) e processo autofágico (TAN et al., 2018). UPR inicia as cascatas de sinalização nas membranas RE e poderia iniciar o processo autofágico em resposta ao cluster de proteína viral (GRATTON et al., 2019). Ensaios *in vitro* demonstram que o ZIKV altera as funções celulares, como diminuir a diferenciação e

bloquear a migração da célula progenitora durante a neurogênese (GOODFELLOW et al., 2018; MARTIN et al., 2018). Cugola et al (2016) observaram a presença de morte celular por apoptose e autofagia durante a infecção pelo ZIKV brasileiro em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Li et al. (2017) mostraram que as proteínas E, C, prM, NS1, NS2A, NS3, NS4B e NS5 são fatores cruciais para os efeitos citopáticos. Golubeva et al. (2020) encontraram proteínas NS do isolado brasileiro de ZIKV interagindo fortemente com proteínas humanas na célula hospedeira. Como também, Liang et al. (2016) mostraram que as proteínas NS4A e NS4B fosforilam a via Akt-mTOR para induzir autofagia e bloquear a neurogênese. A sinalização de Akt-mTOR é essencial para a formação da via autofagossômica e da autofagia secretora (GRATTON et al., 2019). Além disso, a autofagia pode atuar como um mecanismo "pró-viral" aumentando as vesículas autofágicas e, conseqüentemente, aumenta a replicação viral no citoplasma (LIANG et al., 2016; GRATTON et al., 2019).

Dentre os efeitos citopáticos, são registradas alterações morfológicas em organelas. Garcia et al. (2020) observaram *in vivo* uma perturbação da dinâmica na função mitocondrial, bem como sua fragmentação. A disfunção mitocondrial leva à ativação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e das vias de estresse celular, como a UPR. WNV e JEV são indutores comuns de disfunção mitocondrial e liberação de ROS (VALADÃO; AGUIAR; ARRUDA, 2016). Ledur et al. (2020) publicaram o primeiro estudo associando o estresse oxidativo mitocondrial pela infecção pelo ZIKV. Neste relato, foram observados defeitos mitocondriais, assimetria de ROS, quebra de DNA e reatividade glial semelhantes a danos neurológicos (LEDUR et al., 2020). A fragmentação mitocondrial e a liberação de ROS podem ativar a morte celular, caso contrário não há hemostasia (VALADÃO; AGUIAR; ARRUDA, 2016).

2.3.8 Características epidemiológicas e manifestações clínicas

ZIKV foi isolado pela primeira vez e descrito em 1947, na Floresta Zika, localizada na Uganda, por pesquisadores que estavam buscando YFV em isolados de mosquitos *Aedes* spp. Por meio de modelos primatas não-humanos, foram inoculadas suspensões de *Ae. africanus* em macacos *Rhesus* 766 e observados posteriormente, aumento em sua temperatura corpórea (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Até este momento, não haviam relatos confirmados de que ZIKV teria capacidade de infectar humanos. Em 1954, foram reportados os primeiros contágios de ZIKV em hospedeiros humanos. Três pacientes apresentaram testes sorológicos positivos para infecção por ZIKV, na região Oriental da Nigéria (MAC NAMARA, 1954).

Após incidentes de ZIKV em Uganda, casos esporádicos ou recorrentes foram relatados em outros países africanos, como Camarões, República Centro-Africana, Nigéria, Senegal,

Etiópia, Quênia, Tanzânia e Uganda (MUSSO; GUBLER, 2016; POSEN et al., 2016). Na Nigéria, a primeira infecção humana foi relatada em 1954 (MAC NAMARA, 1954), entretanto, apenas em 1966, o ZIKV foi relatado na Ásia juntamente com as evidências da transmissão do vírus pelo *Ae. aegypti* (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969). No início dos anos 1980, o ZIKV foi encontrado no Sudeste Asiático, principalmente na Malásia e na Indonésia (DUONG; DUSSART; BUCHY, 2017). Até então, ZIKV permaneceu endêmico e causou diagnóstico esporádico menor, sem surtos relatados (CHANG et al., 2016; POSEN, 2016; BOYER et al., 2018). A partir dos anos 2000, foi observado o primeiro surto da ZIKV que chegou à Ilha Yap, localizada em Micronésia e alguns anos depois, se espalhou induzindo grandes surtos pelas Ilhas Pacífico e Américas (Tabela 3).

Tabela 3 – Cronologia dos maiores casos do vírus Zika (ZIKV) por região, com descrição das principais manifestações clínicas e a genótipo viral do surto de 2007 à 2016

Período	Região	Manifestações clínicas	Genótipo
2007	Micronésia	Febre, artralgia e conjuntivite;	Asiático
2013-14	Polinésia Francesa	Erupção cutânea maculopapular, fadiga, febre, artralgia ou mialgia, conjuntivite, edemas nas mãos ou pés e cefaleia. SGB e SCZ. Entre outras, encefalite, meningoencefalite, mielite, paralisia facial, neurite óptica, papilite óptica e púrpura trombocitopênica imunológica;	Asiático
2015-16	Brasil	Principalmente SGB e SCZ, anomalias oftalmológicas, encefalomielite, polineuropatias, neuropatia progressiva idiopática, encefalite aguda disseminada, mielite, doenças inflamatórias no SNC;	Asiático

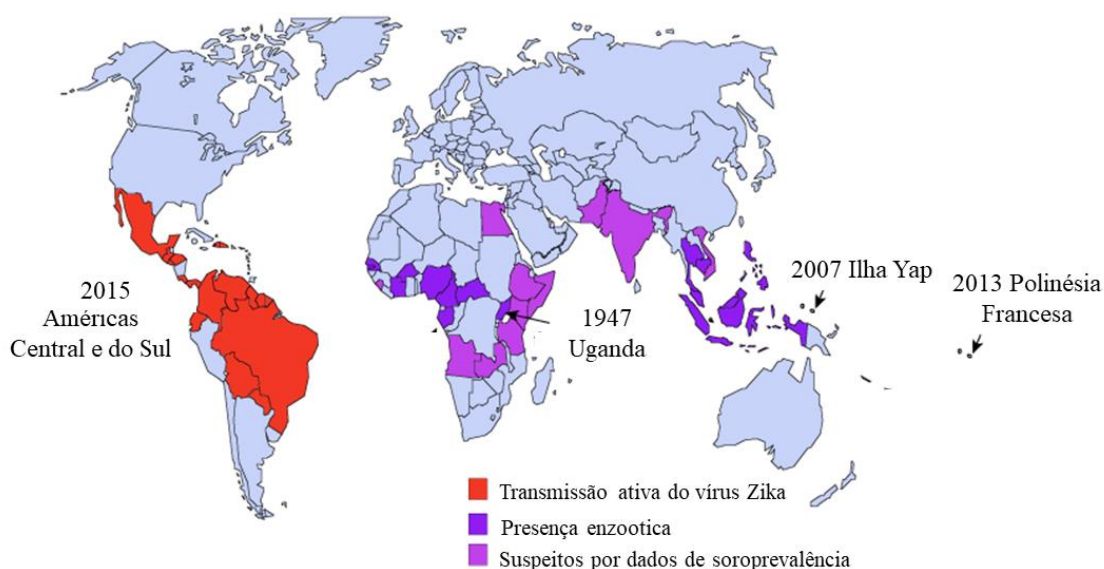
SGB= Síndrome de Guillain-Barré; SCZ= Síndrome Congênita de Zika; SNC= Sistema Nervoso Central. Fonte: Modificada (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008; MUSSO; GUBLER, 2016; SUBISSI et al., 2018; CAO-LORMEAU et al., 2016; CAUCHEMEZ et al., 2016; NUNES et al., 2016; SILVA et al., 2017; VENÂNCIO et al., 2019).

Então, ZIKV foi rapidamente transmitido entre a população, o que gerou impacto epidemiológico em todo o mundo. Os surtos do ZIKV apresentaram um padrão crescente de disseminação. Países do Pacífico Sul e das Américas, predominantemente com zonas subtropicais e climáticas, demonstraram ser os mais afetados (Figura 12).

Em 2007, um caso esporádico do ZIKV foi bem descrito na Ilha Yap, com uma estimativa de 5.000 pessoas infectadas e cerca de 900 pessoas teriam sintomatologia, embora não houvesse registro de hospitalização ou morte (DUFFY et al., 2009; WHO, 2016). A princípio, acreditava-se que o agente causador fosse o DENV, devido à semelhança das

manifestações clínicas e da reatividade cruzada do anticorpo na prova sorológica. Naquela época, Duffy et al. (2009) identificaram 185 casos de suspeita de doença pelo ZIKV, dos quais 49 foram confirmados por testes sorológicos e moleculares. Destas, 45 amostras de soro foram coletadas em até 10 dias após o início da doença e o RNA do ZIKV foi detectado em 15 amostras. O RNA do DENV também foi detectado em 9 dessas 137 amostras de soro testadas, demonstrando uma coinfeção entre o DENV e o ZIKV na população da Ilha Yap (LANCIOTTI et al., 2008).

Figura 12 – Mapa global das infecções do vírus Zika (ZIKV)



Uganda, Ilha Yap, Polinésia Francesa e Américas foram os mais atingidos pelo ZIKV. Fonte: Adaptada (VIRAL ZONE, 2016).

Em 2013, um surto ocorreu na Polinésia Francesa com 30.000-32.000 casos suspeitos de indivíduos infectados pelo ZIKV relatados, representando cerca de 11,5% da população (MUSSO et al., 2018). Os sintomas relatados incluíram erupção maculopapular (93%), fadiga (78%), febre (72%), artralgia ou mialgia (65%), conjuntivite (63%), edema nas mãos ou pés (47%) e dor de cabeça (46%) (MUSSO; GLUBER, 2016). Durante este surto, mais sintomas relacionados à infecção pelo ZIKV foram relatados e mais pessoas foram diagnosticadas do que o surto de ZIKV de cinco anos atrás na Micronésia. A Polinésia Francesa compreende 119 ilhas distribuídas em 5 arquipélagos: Sociedade, Tuamotu, Marquesas, Austrais e Gambier (AUBRY et al., 2017). Segundo Aubry et al. (2017), a soroprevalência para ZIKV encontrada entre os 196 participantes testados foi distribuída da seguinte forma: 37% na Sociedade, 45% em Tuamotu, 57% nas Marquesas e 49% nas Ilhas Austral-Gambier. Essas descobertas sugerem

que, independentemente da localização, os participantes tiveram exposição semelhante ao vírus. Durante este surto, doenças neurológicas associadas à infecção pelo ZIKV foram relatadas em adultos (CAO-LORMEAU et al., 2016). Quarenta e dois pacientes desenvolveram SGB (CAUCHEMEZ et al., 2016) e foram relatados 21 casos de SCZ em recém-nascidos durante e após o surto de ZIKV na Polinésia Francesa, entre 2013 e 2016, por um estudo de caso-controle retrospectivo (SUBISSI et al., 2018). Subissi et al. (2018) apontam que os distúrbios neurológicos em neonatos surgiram antes do surto no Brasil, em 2015.

Devido ao elevado número de casos e à suspeita de envolvimento do vírus no aparecimento das malformações neurológicas em neonatos, o terceiro surto ocorrido no Brasil teve grande repercussão internacional. Estima-se que aproximadamente 440.000-1,3 milhões de indivíduos foram infectados em 2015 (HEUKELBACH et al., 2016). Dentre as regiões brasileiras, a região Nordeste registrou o maior número de casos prováveis (115.000 casos), seguida do Sudeste (97.730 casos), Centro-Oeste (40.497 casos), Norte (15.541 casos) e Sul (1.152 casos) (BRASIL, 2018). Conforme relatado em dezembro de 2015, cerca de três mil casos suspeitos de microcefalia relacionados à infecção pelo ZIKV foram notificados em 658 cidades/distritos nos 20 estados do Brasil (BRASIL, 2019). Esse cenário levou a OMS a declarar o estado de emergência mundial em saúde pública (WHO, 2016). No período de 2015 a 2016, ocorreram 6.625 casos confirmados de SCZ com 108 óbitos em todo o Brasil (HEUKELBACH et al., 2016). Além disso, em Pernambuco, Brasil, a primeira relação de infecção por ZIKV e microcefalia congênita, atual SCZ, ocorreu a partir de RNA viral encontrado em amostras cerebrais de fetos e recém-nascidos com microcefalia congênita (MARTINES et al., 2016).

Em estudos de soroprevalência, Silva et al. (2017) analisaram 40 indivíduos com doenças neuromusculares e neuroinfecciosas. Destes, 29 foram diagnosticados com SGB e 27 eram soropositivos para ZIKV. No Brasil, não foram publicados boletins epidemiológicos sobre a incidência de SGB. Além disso, foram observados perfis de sintomas semelhantes ou idênticos na população brasileira no mesmo período de tempo do surto ocorrido na Polinésia Francesa. Manifestações clínicas semelhantes foram observadas em surtos no Brasil e na Colômbia, com prevalência de SGB principalmente em adultos e defeitos congênitos neurológicos em neonatos (DUARTE et al., 2019). É importante notar que ambos os países estão geograficamente situados em regiões de clima predominantemente tropical, onde o *Ae. aegypti* é generalizado (MÉNDEZ et al., 2017).

Além disso, outros países das Américas relataram casos confirmados de infecção pelo ZIKV, incluindo Estados Unidos da América (EUA), Porto Rico e Equador (HILL; FISCHER;

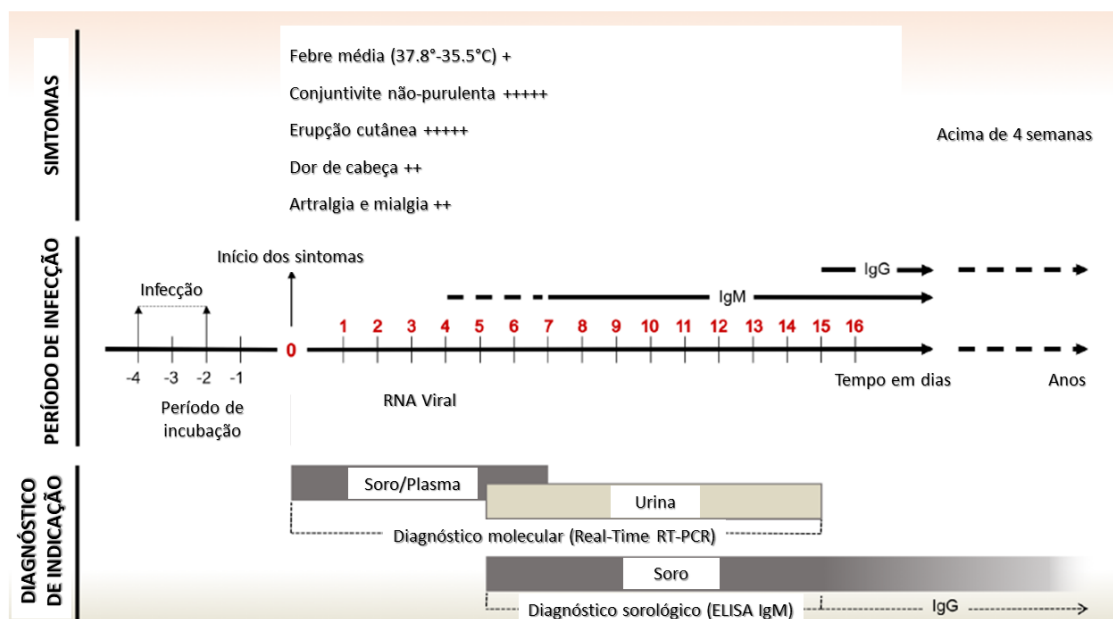
PETERSEN, 2017). A partir desses relatórios, novas rotas de transmissão possíveis foram descritas. Os EUA notificaram 4.830 casos confirmados pela transmissão de mosquitos vetores e um caso sexualmente transmissível (PAHO, 2017). No Equador, a presença do ZIKV foi observada no trato reprodutivo feminino, possivelmente favorecendo a transmissão sexual (ZAMBRANO et al., 2017). Em Porto Rico, as equipes de saúde pública alertaram as mulheres grávidas sobre o risco de transmissão sexual do ZIKV, incentivando o uso de preservativo durante a gravidez (SELVESEN VON ESSEN et al., 2019).

As características clínicas das infecções agudas pelo ZIKV incluem sinais e sintomas brandos, tais como febre, erupção cutânea, fadiga, conjuntivite, artralgia, dor de cabeça, mialgia e dor retro orbital. Geralmente, as manifestações clínicas atingem cerca de 20 a 25% dos indivíduos infectados, com período de incubação do vírus entre 4 e 10 dias (SONG et al., 2016; RELICH; LOEFFELHOLZ, 2017). Até o momento, quatro rotas de transmissão do ZIKV foram relatadas: 1) por meio de picadas de mosquito; 2) transmissão sexual; 3) por meio de transfusão de sangue; e 4) transmissão de animal para humano (JAVED et al., 2017). No entanto, ainda pouco se sabe sobre o que favoreceu o aumento da taxa de infecção e da patogenicidade viral em hospedeiros humanos.

2.3.9 Métodos de diagnóstico

O método diagnóstico para confirmar os casos de ZIKV é adequadamente clínico e envolve ensaios sorológicos e moleculares, semelhantes aos procedimentos para outros arbovírus (Figura 13). Com o uso de ensaios sorológicos, foram detectadas imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) reativas ao envelope glicoproteico do ZIKV pelo Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA). Para testes moleculares, é utilizada a detecção do RNA do ZIKV por amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) em amostras de fluidos como soro, urina ou saliva (MUSSO; GUBLER, 2016; RELICH; LOEFFELHOLZ, 2017).

Figura 13 – Panorama geral dos sintomas, período de infecção e diagnóstico de indicação para pacientes suspeitos de vírus Zika (ZIKV)



Sintomas incluem febre média, conjuntivite não-purulenta, erupção cutânea, dor de cabeça, artralgia e mialgia. ZIKV apresenta período de incubação de até 4 dias antes do início de sintomas. Diagnóstico molecular pode ser feito para detectar RNA viral no soro nos 7 primeiros dias e na urina até 15 dias. Para diagnóstico sorológico, a captura do anticorpo IgM é realizada na fase aguda, de 5 à 15 dias após início dos sintomas. Enquanto que, IgG pode ser diagnosticado no soro do 14º dia de infecção em diante. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa; ELISA= Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima. Fonte: Adaptada (JORGE et al., 2020).

O ELISA é considerado uma das técnicas de diagnóstico laboratorial rápida, fácil e de rotina diária, ajudando na identificação de qual fase viral da infecção, aguda ou convalescente (HERRADA et al., 2018). Devido à semelhança viral do ZIKV com outros flavivírus, são evidenciadas reações cruzadas, principalmente com DENV em ELISA (LANCIOTTI et al., 2008; HERRADA et al., 2018). O ELISA detecta imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) reativas à proteína E ou NS1 de ZIKV (RELICH; LOEFFELHOLZ, 2017; MUSSO; GUBLER, 2016).

Nesse contexto de áreas com co-endêmicas para flavivírus, a RT-PCR acaba sendo necessário para uma confirmação adicional (MUSSO; GUBLER, 2016; ZAIDI, 2019). A RT-PCR pode ser usada para a detecção de RNA de ZIKV em amostras de fluido, como soro, urina ou saliva (RELICH; LOEFFELHOLZ, 2017; MUSSO; GUBLER, 2016). RT-PCR é considerado uma ferramenta poderosa de diagnóstico porque pode confirmar evidências de infecção em pacientes durante a fase aguda da infecção (CDC, 2019). Portanto, é recomendado para laboratórios públicos de saúde tanto os ensaios sorológicos quanto os moleculares para o diagnóstico seguro do ZIKV (HERRADA et al., 2018). Apesar disso, o isolamento do vírus é

considerado padrão ouro para o diagnóstico de ZIKV, no entanto, tem demonstrado baixas taxas de sensibilidade e mais tempo para obtenção do resultado final (YANG; NARAYAN, 2017).

Outros testes sorológicos, como ELISA de captura de anticorpos IgM (MAC ELISA), IgG por ELISA e teste de neutralização por redução de placa (PRNT), podem ser usados para realizar o diagnóstico de ZIKV, como pode ser visto na Tabela 4 (LANDRY; GEORGE, 2016). MAC-ELISA é um teste convencional para capturar IgM por ELISA sanduíche com 100% de especificidade usado em pacientes com doença aguda (HERRADA et al., 2018). PRNT é um método de diluições em série em placas com anticorpos específicos para vírus. Se presentes, esses anticorpos serão neutralizados e a quantidade de unidades formadoras de placa é reduzida (LANDRY; GEORGE, 2016; HERRADA et al., 2018). O PRNT é atualmente o teste sorológico mais específico para o diagnóstico de ZIKV e tem sido usado em áreas co-endêmicas com prevalência de outros flavivírus, por exemplo, DENV (CDC, 2019). Landry e George (2016) sugerem a realização do diagnóstico de pacientes sintomáticos e gestantes assintomáticas pelo teste MAC-ELISA com confirmação por PRNT.

Tabela 4 – Métodos sorológicos disponíveis, suas indicações e aplicabilidades para diagnóstico do vírus Zika

Teste	Tipo de amostra	Uso	Aplicabilidade	Disponibilidade
MAC-ELISA	Soro, fluido cerebrospinal;	Fase aguda;	Indicado a grávidas;	Laboratórios de saúde pública;
PRNT	Soro, sangue completo;	Diferenciação de anticorpos entre flavivirus;	Captura de IgM;	Pesquisa e laboratórios especializados;
IgG ELISA	Soro, sangue completo;	Infecção tardia;	Determina imunidade geral;	-

Fonte: Modificada (LANDRY; GEORGE, 2016).

Na Ilha Yap, a maior parte da população apresentou febre, erupção cutânea, conjuntivite e artralgia. Esses sintomas são comuns a infecções por outros arbovírus (LANCIOTTI et al., 2008; DUFFY et al., 2009). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recebeu essas amostras e realizou IgM por ELISA e RT-PCR. O ELISA confirmou a exposição recente ao DENV. No entanto, com o posterior sequenciamento de ácido nucleico do ZIKV, foi detectada 90% de semelhança entre genomas virais do DENV com a cepa circulante do ZIKV

da época (LANCIOTTI et al., 2008). Acredita-se que este tenha sido o primeiro registro de reação cruzada entre DENV e ZIKV em testes sorológicos.

A reatividade cruzada por ELISA IgM pode ser observada em infecções por ZIKV secundárias a infecções por DENV (LANCIOTTI, 2008). Duffy et al. (2009) descobriram que entre 108 pacientes com teste positivo para ZIKV IgM, 59 não apresentaram RNA do ZIKV no RT-PCR. Portanto, RT-PCR para detectar ZIKV se mostrou necessário para confirmar o diagnóstico de IgM por ELISA (MUSSO; GUBLER, 2016; ZAIDI, 2019). Diferentes *primers* usando sequências alvo E e prM foram usados para detecção de RNA de ZIKV por RT-PCR durante surtos (Tabela 5).

ELISA com confirmação de PRNT e RT-PCR contribuíram para o diagnóstico seguro na população infectada com ZIKV. Sabe-se que o diagnóstico de ZIKV foi padrão em países onde chegaram os principais surtos de ZIKV. Consequentemente, podemos fortificar que houve características semelhantes em pequeno intervalo de tempo em regiões distintas. Não obstante, foram registrados casos graves associados à infecção pelo ZIKV. O SCZ e o SGB surgiram durante os surtos de ZIKV nos anos de 2014 a 2016 (como pode ser visto na tabela 3), bem como, essas novas condições clínicas foram relacionadas como efeitos causados pela virulência do ZIKV.

2.3.10 Opções de tratamento

De acordo com o CDC (2019), continua-se sem tratamentos médicos específicos para infecções ou vacinas contra ZIKV. Sendo assim, é aconselhável que o paciente confirmado com ZIKV trate dos sintomas isoladamente, fazendo consumo de muitos líquidos para combater a desidratação com muito repouso. Remédios, como paracetamol (Tynelol®), são prescritos na tentativa de diminuir a febre e minimizar dor e desconfortos musculares, bem como, evitar uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).

Tabela 5 – Primers de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) usados para detecção de RNA de ZIKV em diferentes países onde ocorreram surtos

Região	Primer	Alvo	Sequência 5'-3'
Micronésia	ZIKV 835	prM	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC
	ZIKV 911		CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC
	ZIKV 860		CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG
	ZIKV 1086	E	CCGCTGCCCCAACACAAG
	ZIKV 1162		CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
	ZIKV 1107		AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA
Polinésia Francesa	ZIKV 835	prM	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC
	ZIKV 911		CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC
	ZIKV 860		CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG
	ZIKV 1086	E	CCGCTGCCCCAACACAAG
	ZIKV 1162		CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
	ZIKV 1107		AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA
América do Sul	ZIKV 835	prM	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC
	ZIKV 911		CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC
	ZIKV 860		CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG
	ZIKV 1086	E	CCGCTGCCCCAACACAAG
	ZIKV 1162		CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
	ZIKV 1107		AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA

Fonte: Modificada (LANCIOTTI et al., 2008; MUSSO et al., 2016; OEHLER et al., 2014; HEUKELBACH et al., 2016; LAHON et al., 2016).

2.3.11 Microcefalia congênita e guillain-barré associados as infecções

O diagnóstico da microcefalia pode ser realizado por meio de ultrassonografia no início da gravidez ou medida do perímetro cefálico nas primeiras 24 horas após o nascimento (OMS, 2018). Cauchemez et al. (2016) acreditam que a infecção pelo ZIKV no primeiro trimestre da gravidez é um fator de alto risco para o fenótipo de microcefalia congênita. Um estudo caso-controle brasileiro realizado em Pernambuco, encontrou RNA viral e antígenos virais no líquido amniótico e em amostras de placenta de gestantes infectadas e em tecidos cerebrais de recém-nascidos. Os exames histopatológicos mostraram calcificação parenquimatosa, nódulos microgliais e necrose (MARTINES et al., 2016). Nesse sentido, Sousa et al. (2018) observaram lesões no córtex cerebral, como edema e proliferação vascular, gliose, apoptose e perda de neurônios. Esses achados patológicos refletem o potencial neurotrópico do ZIKV e demonstram o impacto da infecção no neurodesenvolvimento humano e na ativação dos mecanismos de morte celular (AZEVEDO et al., 2018; SOUSA et al., 2019; SLOMNICKI et al., 2017).

Em contraste, os pacientes com SGB geralmente apresentam fenótipo clínico de neuropatia axonal motora aguda, caracterizada como fraqueza muscular e ausência de reflexos motores (VON DOORN, 2013). O diagnóstico da SGB é feito por meio de exames de eletroneuromiografia, onde são avaliadas as alterações na condução nervosa motora distal (WATRIN et al., 2016). A correlação entre a infecção pelo ZIKV e o início da SGB foi comprovada pela primeira vez no surto da Polinésia Francesa. Em estudos de soroprevalência, entre os 42 participantes do estudo com diagnóstico de SGB, 98% foram positivos para ZIKV IgM, IgG ou todos tinham anticorpos neutralizantes anti-ZIKV (CAO-LORMEAU et al., 2016). Silva et al. (2017) realizaram um estudo no Rio de Janeiro, Brasil, com 29 indivíduos com diagnóstico prévio de SGB. Vinte e sete deles testaram positivo para ZIKV em ensaios ELISA e RT-PCR. Anaya et al. (2017) detectaram IgG e IgM anti-ZIKV em 6 pacientes entre 66 indivíduos diagnosticados com SGB durante o surto de ZIKV em Cúcuta, Colômbia.

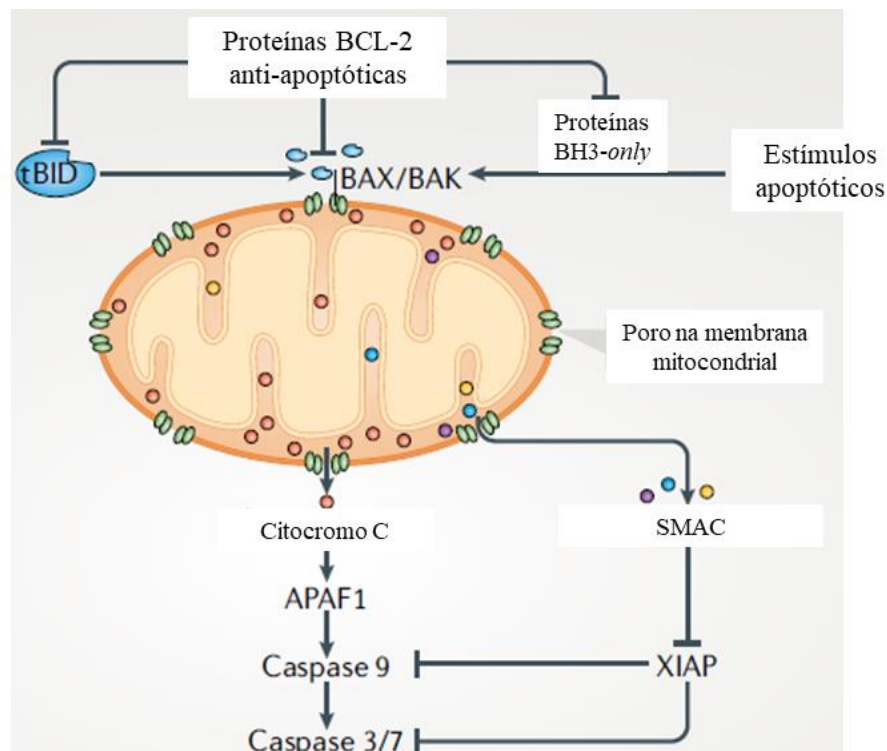
2.4 PROCESSOS PATOLÓGICOS DE MORTE CELULAR

2.4.1 Mecanismos de apoptose

Entre os variados tipos de morte celular, a apoptose foi uma das primeiras descritas e descrita na literatura como morte celular programada. Na apoptose é observada alterações morfológicas a nível microscópico, exibindo encolhimento do citoplasma, fragmentação do núcleo, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos intracelulares. A iniciação, execução e propagação do sinal ativação de apoptose ocorre por meio das formas: intrínseca ou extrínseca. Desbalanço do potencial de membrana mitocondrial, stress ao RE e produção de

ROS, foram descritas como as principais perturbações intracelulares para ativação da via intrínseca de apoptose. Enquanto que na via extrínseca, as perturbações iniciam no ambiente extracelular, principalmente, por meio da ativação dos receptores de morte celular por seus ligantes endógenos (GALLUZZI et al., 2018).

A mitocôndria é uma das principais organelas que estão diretamente correlacionadas ao controle da via intrínseca de apoptose, capaz de mediar a transdução de sinal principalmente por proteínas Caspases (Figura 14). Acredita-se que a mitocôndria desempenha um papel central na regulação da morte celular através do desbalanço na permeabilização de membrana mediado por proteínas da grande família *B cell lymphoma 2* (BCL-2), classificadas como pro-apoptóticas (BCL-2, BCL-X) e anti-apoptóticas (BAX, BAK). O stress mitocondrial é capaz de permitir a predominância de proteínas que apresentam domínio BH3-*only*, principalmente BID, e então essas proteínas efetoras são capazes de ativar BAX e BAK, bem como, inibir BCL-2 e BCL-X. Assim, componentes moleculares mitocondriais são liberados para o espaço citoplasmático por meio de poros gerados na membrana da mitocôndria, dentre eles, Citocromo C, Fator 1 de ativação da peptidase apoptótica (APAF1) e proteínas SMAC. E então juntos, Citocromo C e APAF1 constituem o Apoptossomo, uma estrutura heptamérica que recruta a Pro-Caspase-9 e converte na forma ativa Caspase-9. SMAC livre no citoplasma é capaz de inibir XIAP, uma proteína inibidora da Caspases-9, -7 e -3. Como consequência da Caspase-9 ativa, via de sinalização de clivagem e ativação das Caspase-7 e Caspase-3 são geradas até culminar na fragmentação de DNA da célula e expor a PS na membrana externa da bicamada lipídica celular (BOCK; TAIT, 2020).

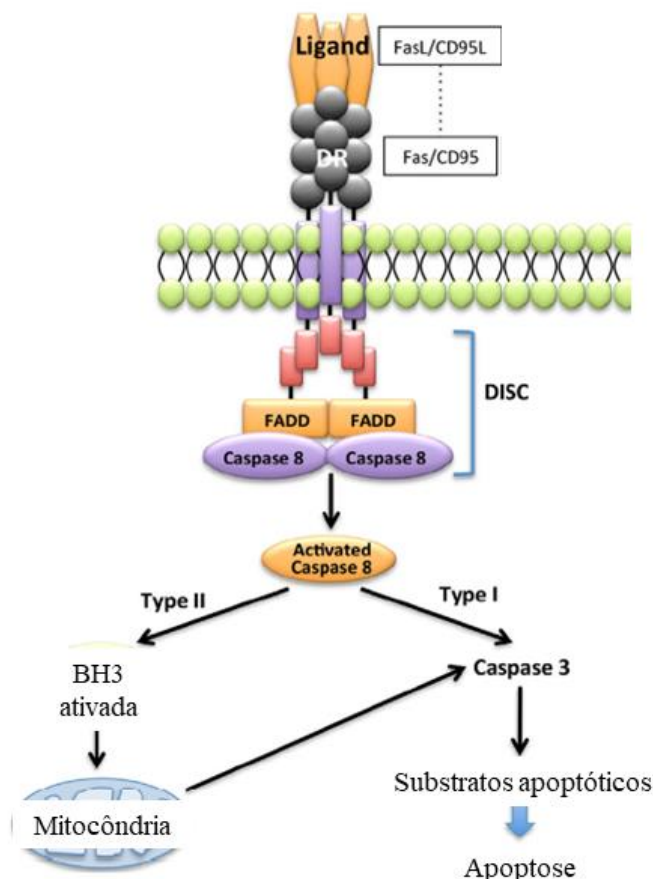
Figura 14 – Via intrínseca de apoptose em células eucarióticas

Estímulos apoptóticos causam ativação da BH3-only da família de proteínas linfoma de células B tipo 2 (BCL-2). As proteínas BH3 inibem as proteínas BCL-2 antiapoptóticas e ativam o efeito pró-apoptótico por BAX e BAK, levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial. Isso permite a liberação das proteínas do espaço intermembranar mitocondrial que ativam as Caspases, principalmente o citocromo c. Citocromo c liga-se ao fator 1 de ativação da peptidase apoptótica (APAF1), formando uma estrutura heptamérica chamada apoptossomo. este recruta e ativa o iniciador de Caspase-9, que cliva e ativa a Caspase-3 e a Caspase-7. Na permeabilização da membrana mitocondrial, também é liberada a proteína SMAC, e esta bloqueia o inibidor de Caspase XIAP, facilitando a apoptose. Fonte: Adaptada (BOCK; TAIT, 2020).

Na via extrínseca de apoptose, Fas (conhecido como CD95, APO-1 ou TNFRSF6) e TNFR1 (também conhecido por TNFRSF1A) são os mais bem descritos envolvidos em desde o reconhecimento do estímulo até a transdução de sinal para iniciação e recrutamento de Caspases intracelulares. Ambos são receptores transmembrana de superfície celular conhecidos por apresentarem dois domínios bem definidos, sendo um domínio exclusivamente extracelular, responsável pela ligação do ligante ao seu sítio de ativação, e outro, representa o domínio intracelular, capaz de ativar e mediar a transdução. A partir da ligação dos endógenos FasL (conhecido como CD95L ou APO-1L) e TNF- α solúvel aos domínios extracelulares de Fas e TNFR1, respectivamente, inicia-se o recrutamento de proteínas em comum, pelo complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (BLOCK; TAIT, 2020; YAMADA et al., 2017).

No Fas, o DISC é constituído pela proteína associada a Fas com domínio de morte (FADD) e Caspases-8, o qual representa um domínio catalítico das Caspases de dimerização e autoprocessamento (Figura 15). Estruturalmente, o receptor Fas apresenta peso molecular de 48kDa e 319 aminoácidos em geral, distribuídos com 157 aminoácidos no domínio extracelular, 17 no domínio transmembrana e 145 no domínio citoplasmático. A partir da ativação do Fas via FasL, FADD inicia o controle da morte celular através de processos autocatalíticos e assim, recruta abundantemente Caspase-8 para propagar o sinal ao longo de proteólises de Caspases efetoras, tais como Caspase-3/7, como também, converte BID em BH3-*only* para permeabilizar a membrana externa mitocondrial. Assim sendo, vemos que a ativação do Fas via FasL possui uma dupla transdução de sinal de apoptose em diferentes tipos celulares, principalmente, no sistema imunológico (YAMADA et al., 2017).

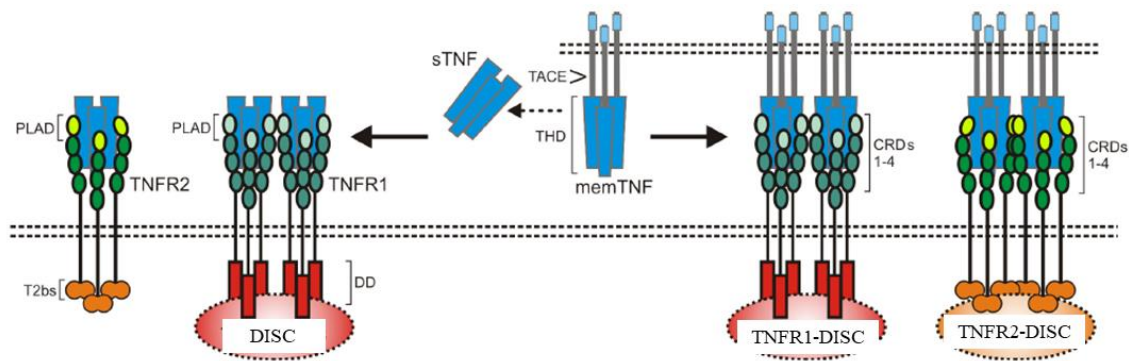
Figura 15 – Sinalização apoptótica via Fas/FasL



Engajamento dos receptores de morte (DRs) com seus ligantes cognatos, como FasL/CD95L, promovendo recrutamento e ativação das proteases iniciadoras de apoptose, com Caspase-8 ativando BH3, que recruta proteínas pro-apoptóticas na mitocôndria, e Caspase-3, para formar substratos apoptóticos e finalizar o mecanismo de apoptose. Fonte: Adaptada (YAMADA et al., 2017).

DISC em TNFR1 é formado pela proteína com domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 (TRADD), fator 2/5 associado ao receptor de TNF (TRAF2/5) e Caspase-8 (LI; YIN; WU, 2013). Enquanto que, na região N-terminal, localizada no domínio extracelular, TNFR1 possui um domínio rico em cisteína (CRD1-4), assim como em TNFR2, favorecendo a especificidade e estabilidade na ligação ao TNF- α , bem como, impedindo aglomerações com outros ligantes e promovendo a capacidade responsiva do receptor (BRANSCHADEL et al., 2010; WAJANT; SIEGMUND, 2019) (Figura 16).

Figura 16 – Formação dos complexos TNFR1-TNF- α e TNFR2-TNF- α



Ambos TNFR1/2 são caracterizados por domínios ricos em cisteína (CRD) em sua parte extracelular. TNFR1 abriga, além disso, um domínio de morte (DD) e TNFR2, um local de ligação TRAF2 (T2bs).

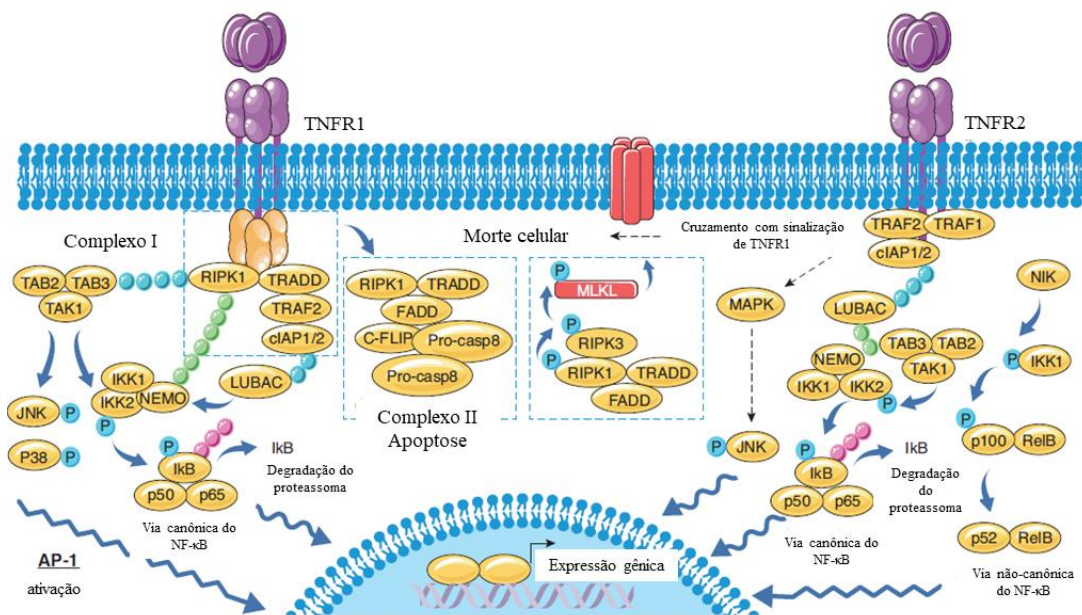
O TNF ocorre em duas formas, como um ligante trimérico ligado à membrana (memTNF) e como uma molécula igualmente trimérica solúvel (sTNF). TACE processa memTNF para sTNF. memTNF estimula ambos os receptores de TNF, enquanto o sTNF falha amplamente em estimular o TNFR2, apesar da ligação de alta afinidade. PLAD= domínio do conjunto de ligação do pré-ligante. Fonte:

Adaptada (WAJANT; SIEGMUND, 2019).

TNFR1 é um receptor pleiotrópico que atua como ativador de sobrevivência ou morte celular, como também, está associado a processos inflamatórios assim como TNFR2. O envolvimento de TNFR1/R2 é dependente da sua resposta responsiva a interação com TNF- α e ambos formam uma rede complexa de sinalização que pode demonstrar sinergismo ou antagonismo. Entretanto, TNFR2 é desprovido de regiões com DD e impedido de induzir a morte celular por via extrínseca de apoptose. Mas TNFR2 ainda exibe fator 1 associado ao receptor TNF (TRAF1/) próximo a região C-terminal. TRAF1 é capaz de recrutar TRAF2 e a proteína 1/2 inibidora celular de apoptose (cIAP1/2) para promover a ativação do fator de necrose tumoral κ B (NF- κ B) por via canônica, bem como, ativar outras proteínas quinases para ampliar seu sinal, por via não-canônica (ou alternativa). Sabe que TNFR1 é expresso em quase

todos os tipos celulares, enquanto que TNFR2, encontra-se apenas na membrana de células mieloides, linfócitos T/B, fibroblastos, epiteliais e gliais (LI; YIN; WU, 2013; WAJANT; SIEGMUND, 2019; ATRETKHANY et al., 2020).

Figura 17 – Visão geral da sinalização em TNFR1/2



A ativação do TNFR1 induz a formação do complexo I que consiste em moléculas adaptadoras como TRADD, RIPK1, TRAF2 e E3 ubiquitina ligases cIAP1/2. As proteínas cIAP1/2 ubiquitinam a si mesmas e a RIPK1, permitindo assim o recrutamento de complexos TAK1/TAB2/TAB3 e LUBAC. LUBAC pode poliubiquitinar NEMO no complexo com IKK1/IKK2. Então, TAK1 pode ativar o complexo IKK que leva à fosforilação de IκB e sua subsequente degradação proteassomal, resultando na liberação de NF-κB. O complexo NF-κB ativo (p50/p65) se transloca para o núcleo e induz a transcrição de genes alvo. Além disso, TAK1 no complexo com TAB2/TAB3 pode desencadear MAP quinases, como p38 e JNK que podem ainda ativar o fator de transcrição AP-1. (Painel do meio)

A desestabilização do complexo I resulta na formação do complexo II composto por RIPK1 desubiquitinado, TRADD, FADD, c-FLIP, pró-caspase 8 seguido pela indução de apoptose. A inibição da caspase converte a via apoptótica em RIPK1/RIPK3/MLKL. (Painel direito) A ativação do TNFR2 leva diretamente ao recrutamento de TRAF1 ou TRAF2 juntamente com moléculas cIAP1/2.

Além disso, pode desencadear o recrutamento de complexos LUBAC, TAK1/TAB2/TAB3 e NEMO/IKK1/2 levando à ativação a jusante da via de sinalização mediada por NF-κB canônica. A ativação de TNFR2 leva ao acúmulo de NIK quinase com mais fosforilação do complexo IKK1 por NIK e processamento de p100. Então, o heterodímero p52/RelB ativo pode translocar no núcleo e ativar a transcrição. A ligação TNFR2 leva à ativação de JNK dependente de TRAF2-MAPK.

Depleção de TRAF2 citosólico por TNFR2 leva à morte celular dependente de TNFR1. Fonte:

Adaptada (ATRETKHANY et al., 2020).

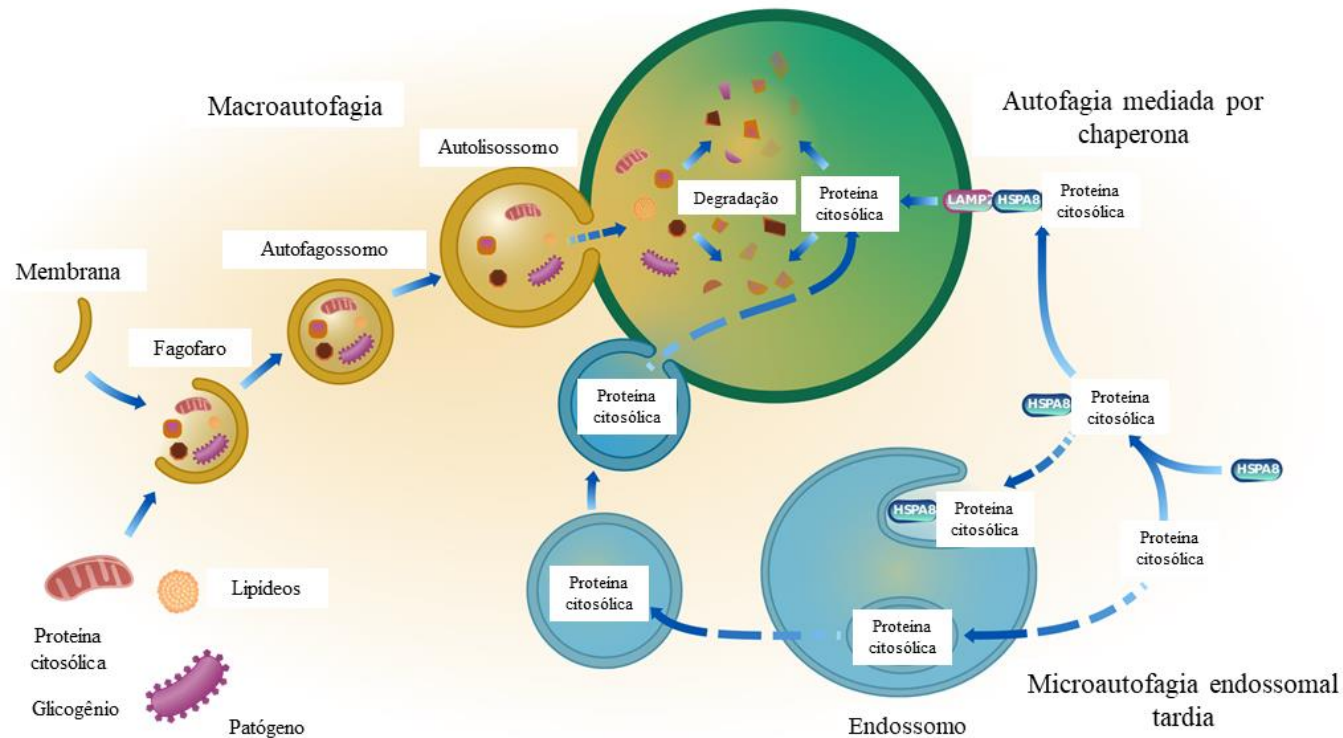
2.4.2 Vias de autofagia

A autofagia, por si só, é uma via de processo fisiológico basal em que ocorre formação de vesículas lisossômicas no citosol, como método de degradar componentes moleculares no interior dessas vesículas por sinais de estímulos (Figura 18). Entretanto, se o sinal for contínuo,

a autofagia pode levar a degradação proteico intensa e gerar a morte para célula. Em geral, podemos classificar a autofagia em macroautofagia, autofagia mediada por chaperona e microautofagia. Na macroautofagia, vemos reciclagem de macromoléculas em sinal a “fome celular” na tentativa do controle da homeostase, a partir da fusão entre o lisossomo e vacúolos endossomais para formar o autofagossomo. Por outro lado, na microautofagia ocorre o recrutamento de pequenas moléculas citosólicas por uma invaginação de membranas lisossômicas sem a formação de autofagossomo. A partir de chaperonas citosólicas de 71 kDa mediam o processo autofágico translocando as proteínas até o lúmen lisossomal para posterior degradação (TANG et al., 2020).

As bases moleculares no processo autofágico envolvem inúmeras proteínas para realizar as etapas principais: iniciação, nucleação, expansão, fusão e degradação (Figura 19). Por meio de um sistema de inibição/estimulação, as vias de sinalização de autofagia são reguladas, principalmente, por cadeia leve 3B das proteínas 1A/B associadas aos microtúbulos (LC3), família das proteínas relacionadas à autofagia (ATG), proteína quinases serina-treonina alvo de rapamicina (mTOR) e a proteína quinase ativadora-AMP (AMPK). Em geral, a estimulação de ATG, AMPK e mTOR são dependentes a partir do sinal de carência de nutrientes, depleção energética e sensibilização celular por hormônios de crescimento, respectivamente. Entretanto, estas proteínas citosólicas estão intimamente conectadas por sensores, adaptadores e indutores moleculares de autofagia, podendo gerar interações cruzadas entre etapas de iniciação e nucleação. Diferente das demais, LC3 é uma das proteínas essenciais na expansão da membrana do fagossomo, e LC3 conjugado a aglomerados de proteínas ATG, passa a ser formado o complexo LC3-I, conjugado à ATG4, e depois à ATG3/7, tornando-se LC3-II e então atuar como marcador do autofagossomo. Ao fim, p62 e mTOR realizam juntos a formação do autofagolisossomo para então dar início a etapa degradação (TANG et al., 2020; LI; HE; MA, 2020).

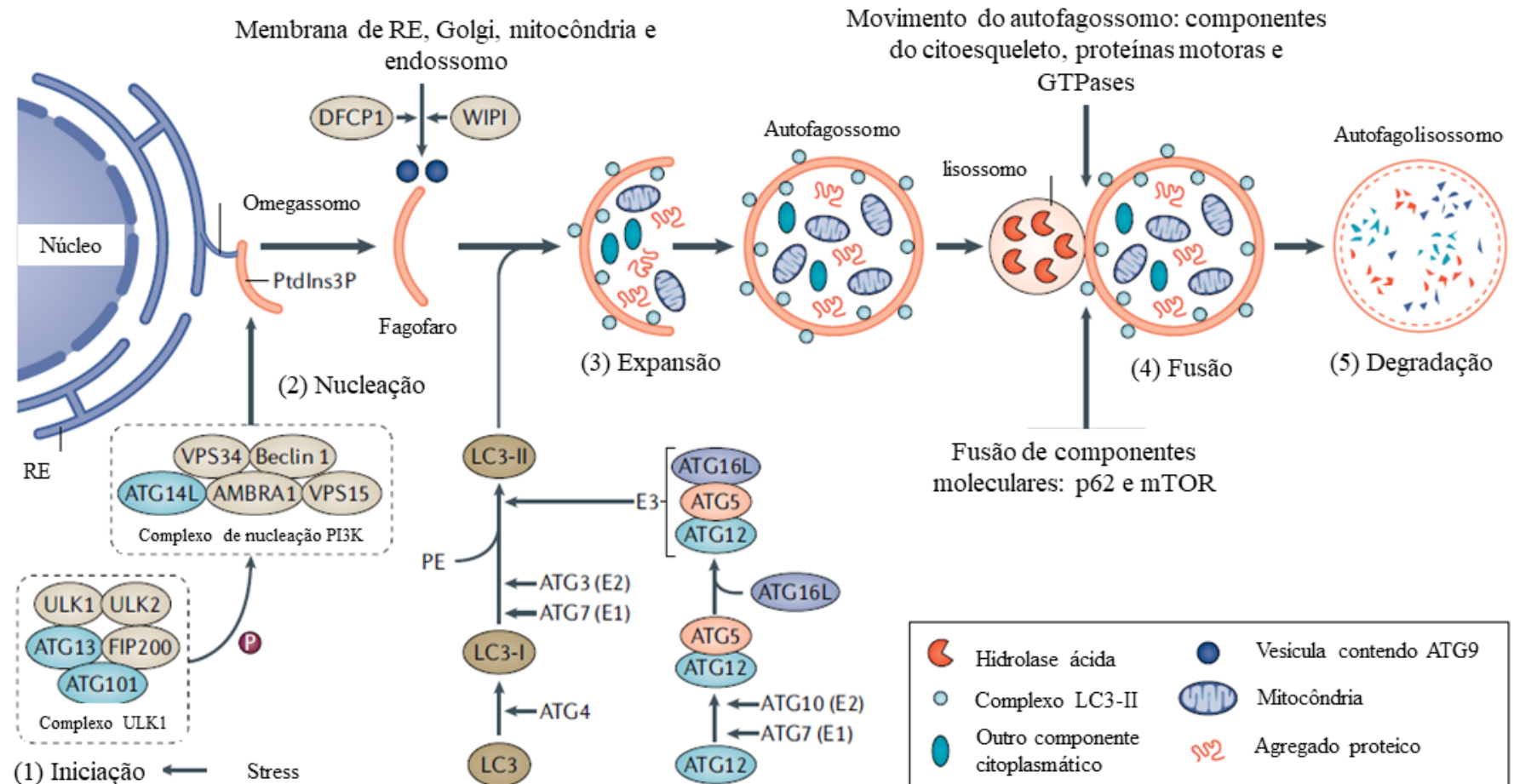
Figura 18 – Tipos principais de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas e microautofagia endossômica tardia



Na macroautofagia, um compartimento de membrana dupla sequestra a carga e a entrega ao lisossoma. Chaperones são usados para entregar proteínas de carga específicas para o lisossoma em autofagia mediada por chaperonas. Na microautofagia, as invaginações da membrana endossômica são usadas para capturar a carga do citosol. A autofagia pode ter como alvo uma ampla gama de entidades que vão desde proteínas e lipídios a organelas celulares e patógenos.

Fonte: REACTOME <{HYPERLINK: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-9612973>}>.

Figura 19 – Base molecular da via macroautofágica



Após a indução, o complexo ULK1-ULK1-ULK2, proteína relacionada à autofagia 13 (ATG13), proteína de interação da família FAK quinase de 200 kDa (FIP200) e ATG101 - fosforila múltiplos substratos, incluindo componentes do complexo de nucleação de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) III promovem a nucleação de fagóforo. O complexo PI3K III compreende subunidade catalítica PI3K tipo 3 (VPS34), subunidade reguladora PI3K 4 (VPS15), beclin 1, beclin 1 associado regulador chave relacionado à autofagia (ATG14L) e molécula ativadora na proteína 1 autofágica regulada por beclin 1 (AMBRA1). Este complexo produz fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P) no omegasomo, que recruta proteínas de ligação de PtdIns3P para a expansão do fagóforo. A entrega de membrana de outras fontes para o fagóforo em expansão requer proteínas de ligação a PtdIns3P, domínio de repetição WD, proteínas interagindo com

fosfoinosítideo (WIPs) e proteína 1 contendo o domínio FYVE de dedo de zinco (DFCP1), bem como o ciclo da proteína transmembrana ATG9L em a forma de vesículas e túbulos de membrana. ATG12–ATG5–ATG16L e a cadeia leve 3 (LC3) da proteína 1 associada ao microtúbulo, participam do alongamento e da conclusão do autofagossomo. A conversão de LC3-I citosólico em LC3-II ligado à membrana é indicativo de indução de autofagia e formação de autofagossomo. O autofagossomo completo então se funde com um lisossoma para formar um autolisossomo, no qual a membrana interna do autofagossomo e as cargas são degradadas por hidrolases lisossomais e eventualmente liberadas para reciclagem. O processo de fusão é regulado por um grande conjunto de moléculas, incluindo componentes do citoesqueleto e proteínas motoras relacionadas, fatores de amarração incluindo a fusão homotípica e complexo de classificação de proteína vacúolo (HOPS), as RAB GTPases e proteína de fixação de fator sensível a N-etilmaleimida solúvel específica complexos de receptor (SNARE). E1, enzima de ativação da ubiquitina; E2, enzima de conjugação de ubiquitina; E3, ubiquitina ligase; RE, retículo endoplasmático; PS, fosfatidiletanolamina. Fonte: Adaptada (TANG et al., 2020).

A autofagia tem potencial para tornar-se uma via paralela a apoptose, a partir das perturbações de stress causadas no RE e ativação da UPR, como consequência da fosforilação de proteína quinase RNA-tipo quinase do retículo endoplasmático (PERK), enzima exigindo-inositol 1 (IRE1) e fator ativador de transcrição 6 (ATF6). PERK, IRE1 e ATF6 fosforiladas são capazes de propagar sinais para restauração da homeostase no lúmen do RE contra aglomeração de proteínas via UPR. Com a persistência na ativação da UPR, por meio da IRE1, pode ocorrer a ativação da Caspase-12, ativação da TRAF2 e cascata de sinalização MAPK/JNK. Então, JNK estimulada bloqueia a expressão gênica de proteínas anti-apoptóticas e contribui para ativação de mecanismos apoptóticos. Enquanto que, PERK e ATF6 são inibidos pela MAPK via p38, o que facilita a expressão de proteínas pro-apoptóticas (NIRMALA; LOPUS, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Compreender as interações biomoleculares do ZIKV sobre a célula hospedeira humana.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar *in silico* interações das proteínas (E, M, prM, pr e NS1) do ZIKV com TNFR (TNFR1, TNFR2, Fas) por *docking* e dinâmica moleculares;
- Quantificar *in vitro* a carga viral de ZIKV em 00, 24 e 48 hpi sob diferentes tratamentos com estimulador/inibidor do processo autofágico;
- Analisar processos de morte celular neuronal por apoptose e/ou autofagia associados a carga viral;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ENSAIOS *IN SILICO*

Os ensaios *in silico* foram efetuados no Laboratório de Patologia Molecular, localizado no Departamento de Patologia, Centro de Ciências Médicas, na Universidade Federal de Pernambuco. Selecionou-se estruturas protéicas em banco de dados de acordo com a propriedade bioquímica das moléculas-alvo do estudo e feitas as respectivas predições e simulações computacionais.

4.1.1 Banco de dados

Inicialmente, foi feita uma busca no banco de dados do RSCB *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN et al., 2000) dos receptores TNF (Fas, TNFR1, TNFR2), bem como, seus agonistas endógenos (FasL, TNF- α) e proteínas do ZIKV (E, M, prM e NS1) com finalidade de usá-las para predições moleculares. Em posterior, foi realizado a seleção das moléculas supracitadas (Tabela 6), a excessão da prM por se encontrar indisponível. Sendo assim, a prM foi para modelagem molecular por homologia através da sua estrutura primária.

Em adição, com a finalidade de complementar a estrutura homotrimérica das proteínas Fas e TNFR1, foi usado o *software* UCFS Chimera v.1.13.1 (PETTERSON et al., 2004).

Tabela 6 – Caracterização das proteínas selecionadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB)

Proteínas	ID	Cadeias	Organismo	Comprimento sequência (aa)	Resolução (Å)
Fas	3THM	R, S, T	<i>Homo sapiens</i>	216	2.1
TNFR1	1EXT	R, S, T		162	1.85
TNFR2	3ALQ	R, S, T		173	3
FasL	4MSV	A		152	2.5
TNF- α	1TNF	A, B, C		157	2.6
E	5IZ7	A, C	Zika vírus (Polinésia Francesa/2013)	504	3.7
M	5IZ7	D, F		75	3.7
NS1	5GS6	A, B	Zika vírus (Brasil/2015)	357	2.85

TNFR1= Receptor do fator de necrose tumoral 1A; TNFR2= Receptor do fator de necrose tumoral 1B; FasL= Ligante de Fas; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa; E= Envelope; C= Capsídeo; NS1= Proteína não-estrutural 1; aa= aminoácidos; Å= Angstroms. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Modelagem molecular

A modelagem molecular por homologia foi feita no servidor I-TEASER (YANG; ZHANG, 2015). Submetemos a sequência da proteína prM de ZIKV a partir do genoma

poliproteico A0A024B7W1, oriundo de um isolado humano da Polinésia Francesa, para modelagem da mesma. Ao final, foi selecionado o melhor modelo preditivo de acordo com valor de *score*, para então otimização e validação do mesmo.

Para refinar as estruturas, foram usadas ferramentas ERRAT e PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) disponíveis no servidor SAVES versão 6.0, para validação da proteína prM modelada. Consequentemente, proteína prM seguiu para predições de *docking* molecular.

4.1.3 Docking molecular

Predições de *docking* tipo proteína-proteína foram realizadas pelo servidor *ClusPro 2.0: protein-protein docking* (KOZAKOV et al., 2017). Para cada receptor (Fas, TNFR1, TNFR2), foram realizadas predições com ligantes endógenos (FasL, TNF- α) ou proteínas virais (E-M, E, M, prM, pr, NS1). A partir dos resultados gerados das predições proteína-proteína, usou-se o menor valor de *score* no *Coefficient Weights* para modelo balanceado. De acordo com Kazakov et al. (2017), peso de coeficiente é calculado por:

$$E = 0.40E_{rep} + 1 + -0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{dars}$$

Todos complexos dos receptores e seus respectivos endógenos (Fas-FasL, TNFR1- TNF- α , TNFR2- TNF- α) foram visualizados em 3D pelo Chimera e depois, comparados estruturalmente aos complexos formados por estes receptores com proteínas virais (E-M, E, M, prM, pr, NS1).

Utilizou-se a ferramenta de diagramas DIMPLOT do *software* LigPlot⁺ v.2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) para identificar interação química entre aminoácidos das proteínas nos complexos receptor-endógeno e receptor-viral. Como critério de seleção, apenas ligações de hidrogênio foram consideradas relevantes e favoráveis a interação com receptor.

Então, foram excluídos complexos em que proteínas virais apresentaram ligações fora do sítio de ligação no receptor. Por outro lado, complexos dos receptor-endógeno e receptor-viral que demonstraram compartilhar ligações de hidrogênio em aminoácidos semelhantes para ambos modelos, seguiram para simulações de dinâmica molecular.

4.1.4 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular foi realizada por meio do *software* GROMACS versão 2016.2 (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995) com GROMOS/53A6 como

campo de força para todas simulações. Inicialmente, as estruturas tridimensionais foram lançadas em uma caixa cúbica com moléculas de água SPC/E e adicionados íons Na^+ e Cl^- , para neutralização do meio. Foi usado o método com 50.000 passos na minimização de energia do sistema.

Foi realizado o equilíbrio do sistema por meio de dois equilíbrios: 1) número de partículas constante, volume e temperatura (NVT); e 2) número de partículas constante, pressão e temperatura (NPT). NVT apresentou temperatura constante de 310 Kelvin (K) por 10 nanossegundos (ns). NPT obteve pressão e temperatura constantes de 1bar de 310K, respectivamente, em 10 ns. Por fim, a fase de produção ocorreu em 310K. Utilizou-se algoritmo *Linear Coonstraint Solver* (LINCS) para restringir as ligações covalentes e método *Particle Mesh Edwald* (PME) para avaliar as interações eletrostáticas. Todas as trajetórias na dinâmica molecular foram capturadas em cada 10 picossegundos (ps), com tempo de produção de 100 ns. Para determinar a estabilidade das ligações, usamos parâmetros de desvio médio dos átomos (RMSD), superfície de acessibilidade do solvente (SASA) e raio de giro (R_g).

Por fim, foi criado um pequeno vídeo por meio do *software* VMD 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) na finalidade de exibir a trajetória da dinâmica molecular dos complexos testados.

4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Cultivo, expansão e armazenamento das células

Os ensaios *in vitro* foram realizados nos setores de Biotecnologia, Biologia Molecular e Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, na Universidade Federal de Pernambuco. Utilizou-se estufa incubadora umidificada para cultivo e expansão de células sob condições de temperatura em 37 °C e atmosfera à 95% de ar e 5% de CO_2 (Thermo Scientific, USA).

As linhagens de células renais de macaco verde africano (VERO) e neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram cordialmente cedidas pelo Prof. Del Sal G., da Universidade de Trieste, na Itália.

O cultivo de células VERO foi utilizado o meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco®), 10% de L-glutamina (Sigma-Aldrich®) e 1% Penicilina-Streptomicina (Sigma-Aldrich®). Para as células SH-SY5Y, o cultivo foi realizado em meio *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) + F12 de Ham (Sigma-Aldrich®), depois suplementado com 10% de

Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco®), 10% de L-glutamina (Sigma-Aldrich®) e 1% Penicilina-Streptomicina (Sigma-Aldrich®).

Usou-se garrafas de 75 cm² (Greiner®) para fazer a expansão das células e obtenção do número estabelecido no delineamento experimental. Manutenções eram feitas cerca de três vezes durante a semana para garantir a expansão das células. Ambas as linhagens celulares eram tratadas com solução de Tripsina (Sigma-Aldrich®) para retirar a aderência celular, bem como, as mesmas eram lavadas com Tampão Fosfato-Salino (PBS) para garantir a limpeza de restos de reagentes.

Após atingir o quantitativo celular satisfatório, as células eram submetidas a alíquotas com dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguidas armazenadas em freezer ultra congelador à -80 °C. As células VERO foram utilizadas exclusivamente para processo da expansão do ZIKV e as SH-SY5Y foram usadas posteriormente para ensaios experimentais de infectividade viral.

4.2.2 Expansão viral do isolado ZIKV PE243

Alíquotas contendo o genótipo asiático de um isolado pernambucano ZIKV PE243 foram generosamente cedidas pelo Prof. Lindomar José Pena, do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães, da FIOCRUZ Pernambuco.

Utilizou-se garrafas de 75 cm² (Greiner®) para semear as células VERO e infectá-las com 50 µL de solução stock contendo ZIKV PE243, para então acrescentar 5 mL de meio DMEM suplementado com 2% de SBF e levar à estufa incubadora por 1 hora.

Delicadas versões eram realizadas nas garrafas há cada 15 minutos dentro desse tempo de incubação para garantir a adsorção do vírus, seguindo metodologia de Agbulos et al. (2016). Após 1 hora, 10 mL de DMEM eram acrescentados, com 2% de SBF, e assim levadas novamente por mais 72 horas em estufa incubadora.

Passadas as 72 horas, com as células em 90% de confluência, as garrafas foram lavadas com PBS e seu sobrenadante era repassado para novas garrafas contendo VERO por 1 hora em incubadora, seguindo as versões a cada 15 minutos. Então, ao final do tempo foi adicionada mais 10 mL de DMEM com 2% de SBF. Seguiu-se novamente incubação por mais 72 horas para, ao termino, o sobrenadante foi congelado em -80 °C. Por fim, uma alíquota desse sobrenadante foi usado para titulação viral (COELHO et al., 2017).

4.2.3 Titulação viral

Foi usada células VERO, diluídas em DMEM com 10% de SBF, para alcançar a concentração ideal de 10⁶ células/mL. Depois as células foram cultivadas em uma placa de

fundo chato com 96 poços (Greiner®), incubada por 48 horas para atingir a confluência de 90% (AGBULOS et al., 2016).

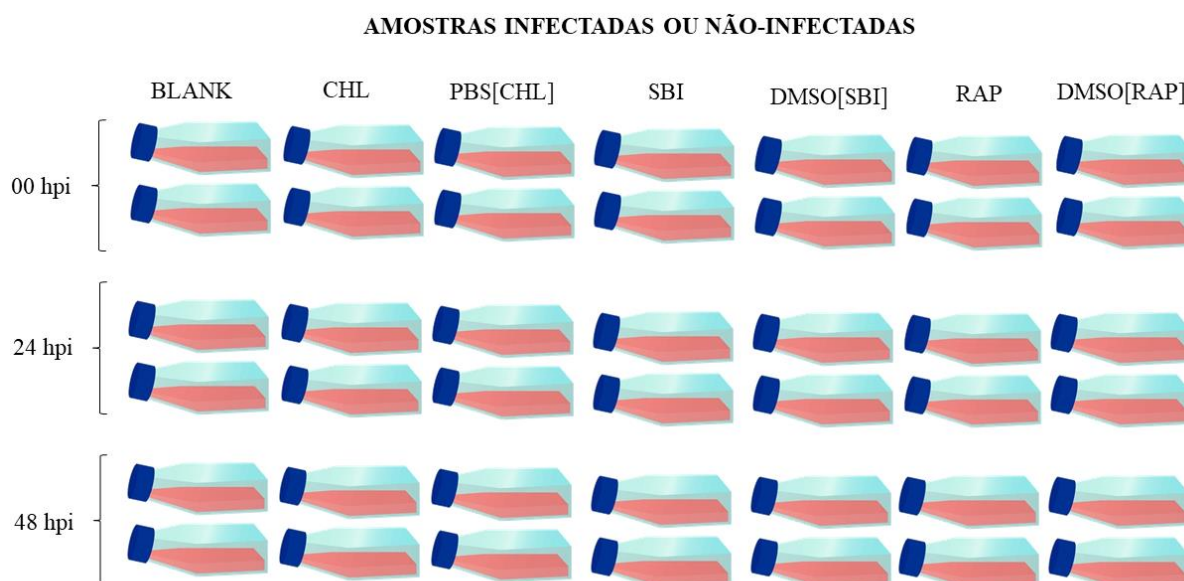
Passadas as 48 horas, vertemos a placa para retirada do meio, e então, retirou-se uma alíquota viral de 150 µL para diluição em meio DMEM, suplementado com 2% de SBF, com múltiplas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-12} , obtendo ao final 7 repetições e 1 controle. Foi então distribuída em cada poço 50 µL e posteriormente, essa placa foi incubada por 1 hora, vertendo a cada 15 minutos. Depois, em cada poço, acrescentamos 100 µL de meio suplementado novamente para seguir em incubação por 120 horas, analisando os efeitos citopáticos e por fim, tituladas (REED; MUENCH, 1938).

4.2.4 Tratamento celular para infectividade viral

Foi delimitado em dois grandes grupos, divididos em 7 grupos com células infectadas e outros 7 com células não-infectadas, todos com células e meio com 2% de SBF em duplicatas (Figura 20). O grupo BLANK representa nosso controle sem tratamento de estimulador/inibidor da autofagia. Grupos com DMSO foram expostas ao reagente em uma única vez, na tentativa de evitar viés de publicação, durante análise de dados, por ter potencial citotóxico. Os grupos tratados com Cloroquina Difosfato (Biochemicals®) ou SBI (Sigma-Aldrich®), foram utilizados como bloqueadores de autofagia, enquanto que Rapamicina (Biochemicals®) foi usada para estimular o processo autofágico.

As células SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Greiner®) e alíquotas com *Multiplicity of Infection* (MOI) de 0,1 do ZIKV foram adicionadas somente em 7 grupos, chamando-os de grupos infectados. Todos os grupos (7 grupos infectados e 7 grupos não-infectados) seguiram para incubação vertidas a cada 15 minutos por 1 hora. Após passado o período de adsorção viral, foi acrescido meio MEM suplementado à 2% de SBF. Por fim, os 14 grupos foram incubados por 0, 24 ou 48 horas. Então, ao final de cada tempo de incubação, separou-se o sobrenadante do quantitativo celular e, imediatamente, esse sobrenadante seguiu para o ensaio de quantificação da carga viral e o quantitativo celular para avaliação de apoptose e autofagia.

Figura 20 – Panorama do desenho experimental no tratamento celular para infectividade viral

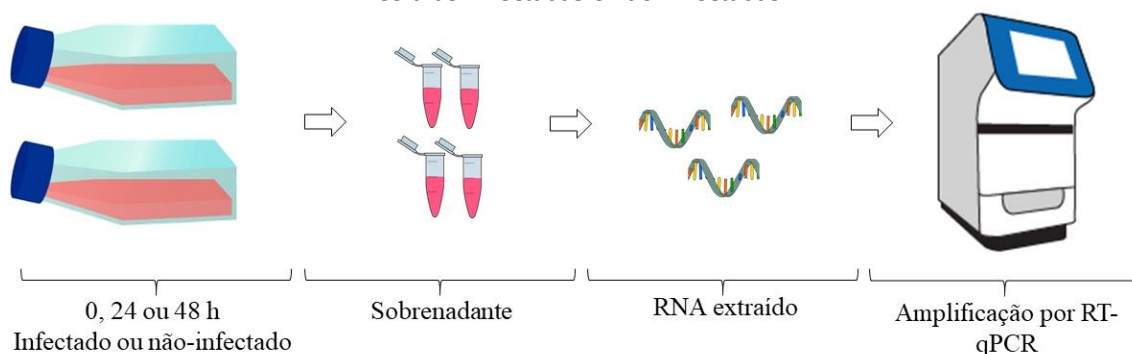


BLANK: Células + meio com 2% de SBF; CHL: Células + meio com 2% de SBF + Cloroquina; PBS[CHL]: Células + meio com 2% de SBF + Cloroquina diluído em PBS; SBI: Células + meio com 2% de SBF + SBI; DMSO[SBI]: Células + meio com 2% de SBF + SBI diluído em DMSO; RAP: Células + meio com 2% de SBF + Rapamicina; DMSO[RAP]: Células + meio com 2% de SBF + Rapamicina diluída em DMSO. Garrafas em duplicatas incubadas com ou sem vírus durante 00, 24 ou 48 horas pós-infecção (hpi). Fonte: Próprio autor (2021).

4.2.6 Quantificação do RNA viral

A partir do sobrenadante dos 7 grupos infectados, foram extraídos o RNA viral de seus respectivos sobrenadantes (Figura 21). Utilizou-se o kit QIAamp RNA Mini Spin (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante e a metodologia de Lanciotti et al. (2008) para o gene da proteína E. O RNA de ZIKV foi obtido pelo kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System com Patinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) por meio da amplificação na RT-qPCR semi-quantitativa em única etapa na plataforma ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems®).

Figura 21 – Etapas do processo de extração do RNA viral oriundas de amostras do sobrenadante de células infectadas e não infectadas



Fonte: Próprio autor (2021).

4.2.7 Avaliação de apoptose e autofagia

Todas as amostras por grupo foram utilizadas para avaliar os processos de apoptose e autofagia. Inicialmente, após o término dos tempos de incubação, todas as células foram lavadas com PBS, acrescentadas de Tripsina e neutralizadas com meio MEM. Depois as mesmas foram submetidas a centrifugação e por isso, as células foram transferidas das garrafas para tubos Falcon de 15 mL previamente identificados. As células foram novamente lavadas com PBS, fixadas em formaldeído a 1%, permeabilizadas com Tween-20 durante 15 minutos, lavadas novamente com PBS e Tween.

Então, o quantitativo celular de cada grupo infectado e não-infectado foi dividido em duas amostras para serem realizadas as análises de morte celular e autofagia simultaneamente. Para apoptose, utilizamos o kit de morte celular composto por Anexina V (AV, Invitrogen®) e 7-Amino-Actinomicina (7-AAD, Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. Na autofagia, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-LC3B (Anti-rabbit, ABCAM®) e anti-P62 (Anti-mouse, ABCAM®), de acordo com manual do fabricante. Após novas lavagens com PBS, foi acrescido seus respectivos anticorpos secundários conjugados anti-LC3B (Alexa Fluor 488, Anti-rabbit, ABCAM®) e anti-P62 (Alexa Fluor 647, Anti-mouse, ABCAM®).

Em ambas análises de morte celular, por apoptose e/ou autofagia, as células foram avaliadas inicialmente por tamanho (volume) e complexidade interna (ou granulosidade). Em seguida foi adquirida a intensidade da fluorescência emitida pela marcação dos anticorpos. No total foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra a partir do Citômetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences), com ajuda técnica e expertise na interpretação destes dados.

pelo Professor Fabrício Souto. Os dados foram apresentados com representações de gráficos gerados pelo *software* FlowJo versão 10.7.1.

4.2.8 Análise estatística

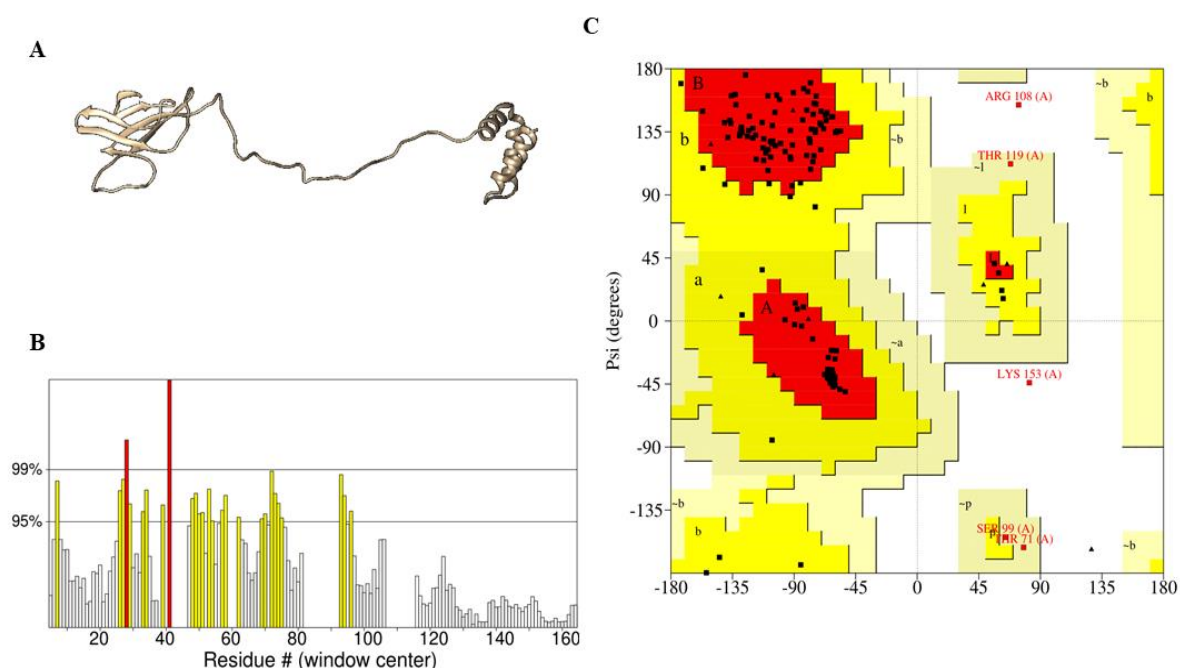
A comparação quantitativa foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) em *Two-Way* com post Hoc, tratado como dados distribuídos de forma não-normal de múltiplas variáveis e assumindo significância em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO IN SÍLICO

Nossa modelagem molecular, do tipo homologia, da proteína prM de ZIKV gerou um modelo de melhor estabilidade entre cinco propostos, sendo este modelo considerável aceitável com fator de qualidade total de 79%, boa resolução e resíduos de aminoácidos em regiões mais favoráveis (Figura 22).

Figura 22 – Validação de modelagem da proteína prM do vírus Zika (ZIKV)



(A) Modelo estrutural da prM de ZIKV gerado no I-TEASER e visualização 3D pelo Chimera. (B) Gráfico do ERRAT com valor médio de 79% de aceite, demonstrando regiões de alta qualidade (vermelho), boa qualidade (amarelo) e baixa qualidade (branco). (C) Ramachandran Plot com 132 resíduos (87,4%) em regiões mais favoráveis, 14 resíduos (9,3%) em regiões adicionais permitidas, 3 resíduos (2%) generosamente permitidos e 2 resíduos (1,3%) de regiões não-permitidas.

Para *dockings* com o receptor Fas, todos os ligantes testados se ligaram ao receptor e exibiram menor energia de ligação do que o endógeno FasL. Em TNFR1, apenas as proteínas E-M, E e M apresentaram energia de ligação menor do que TNF- α . Entretanto, nenhuma das proteínas virais apresentaram valor de *score* menor do que TNF- α para TNFR2 (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de *scores* gerados por *docking* dos receptores de TNF (FAS, TNFR1, TNFR2) com seus ligantes endógenos (FasL, TNF- α) ou com proteínas do vírus Zika (E-M, E, M, prM, pr, NS1)

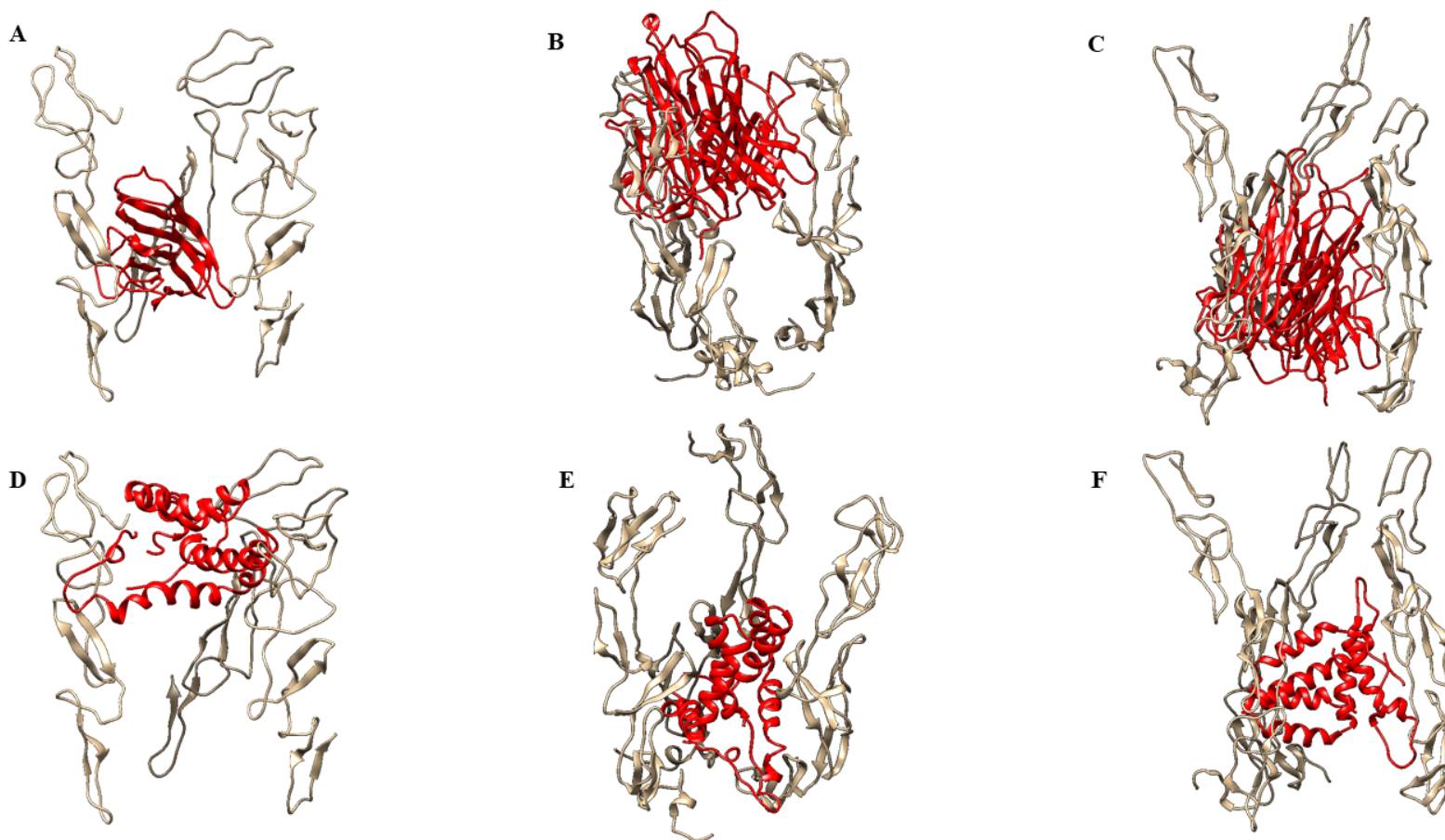
Ligante	Weighted score		
	Fas	TNFR1	TNFR2
Endógeno	-990,9	-1300,7	-1839,4
E-M	-1559,3	-1306,4	-1528,1
E	-1407,0	-1508,8	-1498,9
M	-1433,0	-1382,0	-1383,3
prM	-1222,7	-1296,2	-1361,2
pr	-1073,3	-1249,6	-1083,1
NS1	-1134,3	-1134,3	-1466,1

Quando os complexos foram analisados estruturalmente, a proteína M foi a única das proteínas do ZIKV que demonstrou posição de interação favorável e mesmo local de ligação comparado aos ligantes endógenos em todos os receptores (Figura 23). As demais proteínas (E-M, E, prM, pr, NS1) não apresentaram comportamento de ligação favorável com os receptores ou afinidade em locais semelhantes aos endógenos.

A partir da visualização das ligações de hidrogênio dos complexos, viu-se que os aminoácidos que constituem as cadeias heterotriméricas (cadeias R, S, T) dos receptores Fas, TNFR1 e TNFR2 interagem com as cadeias homodiméricas da proteína M (cadeias D, F). Em geral, os resultados mostram que a proteína M ligou-se em pelo menos uma de suas cadeias dos receptores (Tabela 8). Além disso, as ligações de hidrogênio formadas no complexo TNFR2-M, foram principalmente com resíduos de Arg 77 e Arg113 do receptor, os quais são compartilhadas também com TNFR2-TNF- α (Figura 24).

A partir das simulações de dinâmica molecular, vimos o comportamento dos receptor-endógeno e receptor-vírus em simulações com temperatura, pressão e tempo estáveis. Quando observados valores de RMSD, o complexo proteico Fas-M demonstrou estabilidade do sistema a partir de 10 ns, semelhante ao complexo Fas-FasL, finalizando em 100 ns com 1,5 nm e 1 nm, respectivamente (Figura 25). Além disso, observamos que Fas-M apresenta acoplamento semelhante em área de superfície ao Fas, com valores semelhantes de SASA e integridade estrutural secundária por raio de giro, ao longo de ambas as simulações. Entretanto, TNFR1-M (Figura 26) e TNFR2-M (Figura 27) apresentaram baixa estabilidade se comparado ao TNF- α ao longo do tempo.

Figura 23 – Complexos proteicos formado por predições de *docking* molecular entre ligantes endógenos (FasL, TNF- α) ou proteína M do vírus Zika com os receptores de TNF (Fas, TNFR1, TNFR2)



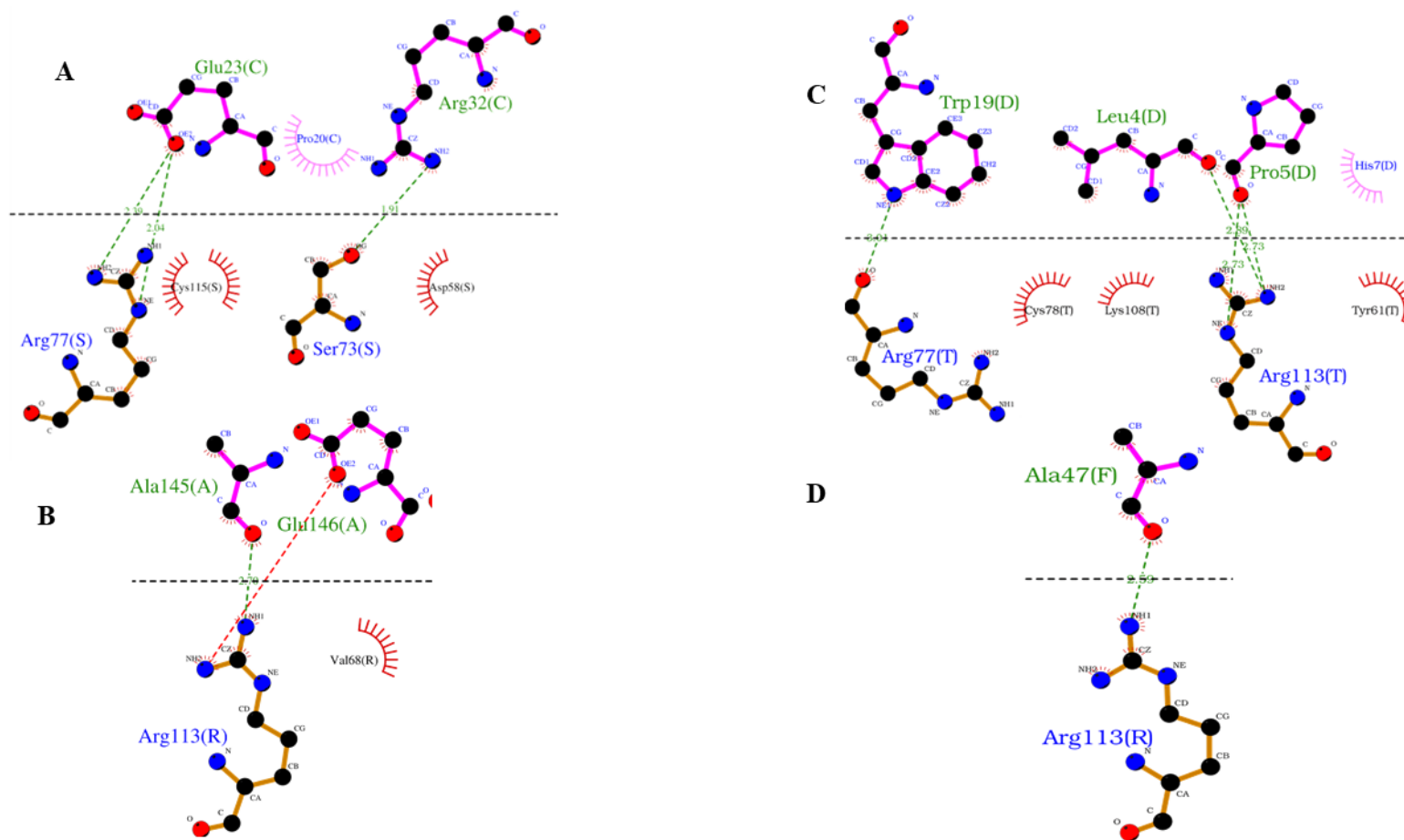
(A) Fas-FasL; (B) TNFR1-TNF- α ; (C) TNFR2- TNF- α ; (D) Fas-M; (E) TNFR1-M; (F) TNFR2-M.

Tabela 8 – Descrição das interações por ligações de hidrogênio nos complexos proteicos (Fas-M, TNFR1-M, TNFR2-M) por cadeias das proteínas, resíduos de aminoácidos e distância das ligações formadas

Complexos	Cadeias	Resíduo(posição)		Distância (Å)
Fas-M	T-F	GLY31	SER6	2,82
		GLN32	ARG10	2,67
		GLU91	ARG23	2,74
	T-D	ASP47	ARG38	2,69
		ASP30	ARG31	2,79
		ASP30	ARG31	3,01
	R-D	PRO40	SER55	2,77
	S-D	PHE33	ARG15	3,25
		GLY31	ARG15	2,91
		ASP30	ARG15	2,78
		ASP30	ARG15	2,61
		ASP30	ARG15	2,65
		ASP30	SER16	2,79
TNFR1-M	S-D	GLU161	THR3	3,15
		GLU70	HIS7	2,70
TNFR2-M	T-F	GLN109	ARG23	2,68
		GLN110	ARG23	2,83
		GLN63	ARG23	2,72
		CYS74	THR3	2,70
		SER73	THR3	3,08
		LYS34	SER16	2,58
		SER76	ALA1	2,79
		TRP67	THR14	2,59
		ASP25	THR14	2,98
		TYR24	ARG15	2,87
		TYR24	ARG15	3,27
		GLN26	ARG15	2,78
		GLN26	ARG15	2,63
		ALA105	ARG38	2,71
	T-D	ARG77	TRP19	3,01
		ARG113	LEU4	2,39
		ARG113	PRO5	2,73
		ARG113	PRO5	2,73
		GLU110	VAL2	3,00
	R-F	ARG113	ALA47	2,59
		GLN109	TRP51	2,74
		GLN109	LYS60	2,50

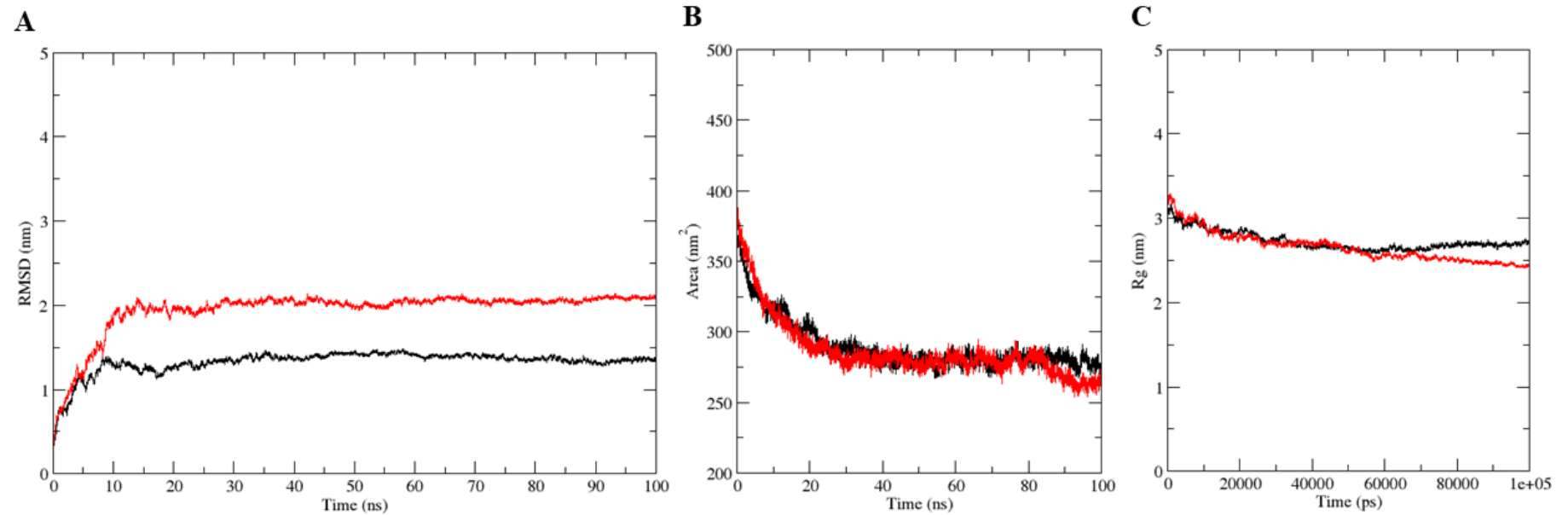
GLY= glicina; SER= serina; GLN= glutamina; ARG= arginina; ASP= asparagina; PRO= prolina; PHE= fenilalanina; THR= treonina; GLU= glutamina; HIS= histidina; CYS= cisteína; LYS= lisina; ALA= alanina; TYR= tirosina; LEU= leucina; VAL= valina; TRP= triptofano.

Figura 24 – Ligações de hidrogênio semelhantes formadas nos complexos TNFR2-TNF- α e TNFR2-M



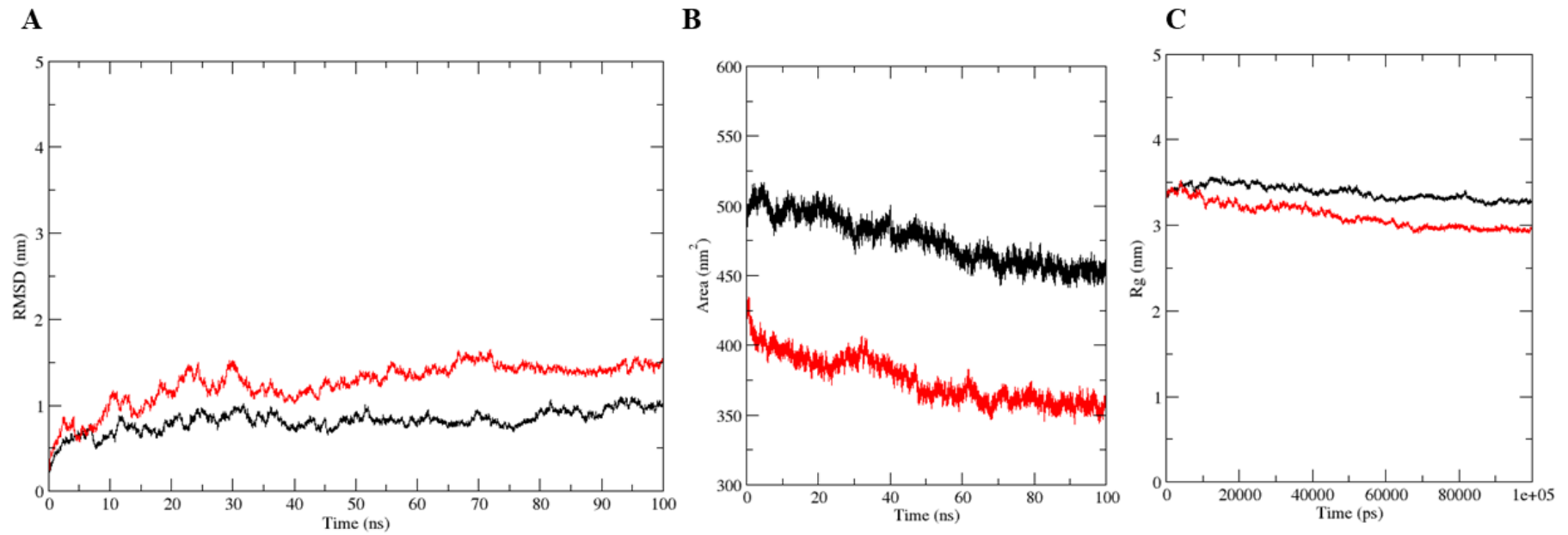
(A) Resíduos Arg77 e Ser73 da cadeia S do TNFR2 interagindo respectivamente com Glu23 e Arg32 da cadeia C do TNF- α ; (B) Resíduos Arg113 da cadeia R do TNFR2 formando ligações de hidrogênio com Ala145 e Glu146 da cadeia A do TNF- α ; (C) Resíduos Arg77 e Arg113 da cadeia T do TNFR2 interagindo com Trp19, Leu4 e Pro4 da cadeia D da proteína M; (D) Resíduos Arg113 da cadeia R do TNFR2 ligado a Ala47 da cadeia F da proteína M.

Figura 25 – Plots das simulações em dinâmica molecular entre os complexos Fas-FasL, cor preta, e Fas-M, cor vermelha



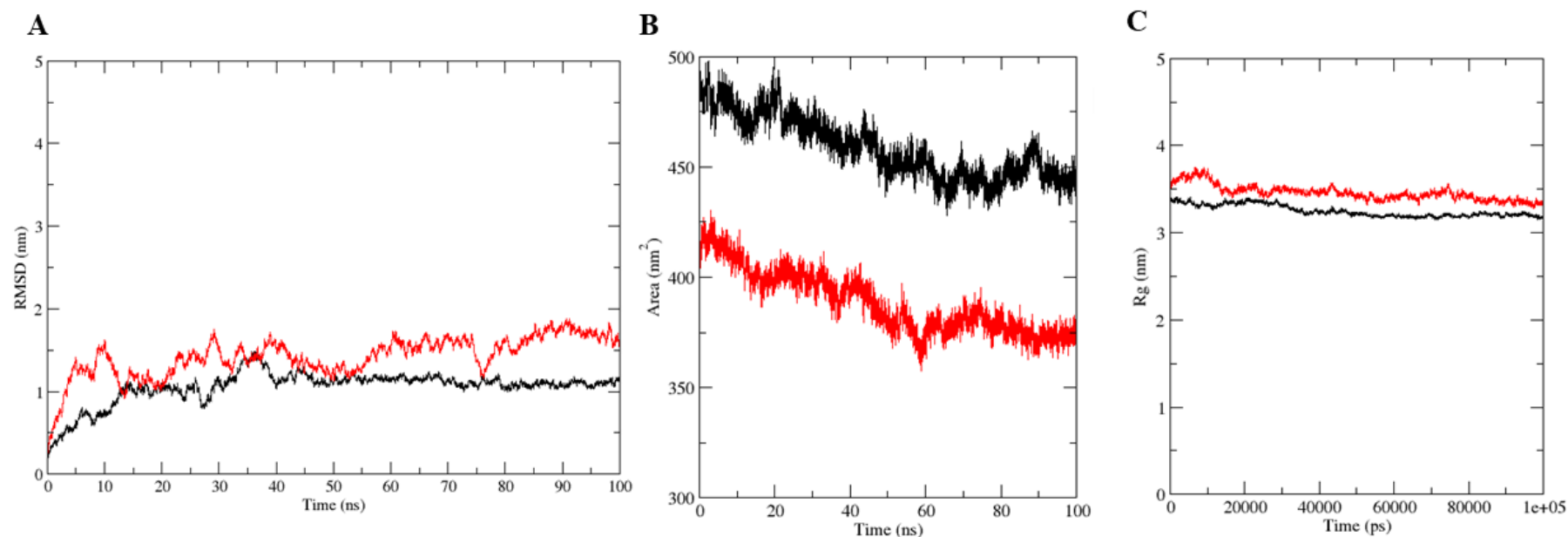
(A) Comportamento de estabilidade iniciou no tempo de 10 ns em ambos complexos; (B) Proteína M e FasL apresentaram acoplamento semelhante em área de superfície ao receptor Fas; (C) Fas-FasL e Fas-M demonstram integridade estrutural secundária ao longo da simulação.

Figura 26 – Plots das simulações em dinâmica molecular entre os complexos TNFR1-TNF- α , cor preta, e TNFR1-M, cor vermelha



(A) Comportamento dos complexos demonstra variação ao longo do tempo dos 100 ns, entretanto, TNFR1-M obteve valor de 1,5 nm sendo maior do que TNFR1-TN- α , com 1 nm; (B) Proteína M e FasL não apresentaram acoplamento semelhante sobre área de superfície ao receptor TNFR1; (C) TNFR1-TN- α e TNFR1-M demonstram integridade estrutural secundária ao longo da simulação.

Figura 27 – Plots das simulações em dinâmica molecular entre os complexos TNFR2-TNF- α , cor preta, e TNFR1-M, cor vermelha



(A) TNFR2-M obteve valor de 1,5 nm de RMSD e comportamento instável ao longo de 100 ns (B) Proteína M não apresentou acoplamento semelhante sobre área de superfície do TNFR1 (C) TNFR2-M demonstrou integridade estrutural secundária ao longo da simulação semelhante ao TNFR2-TNF- α .

5.2 ANÁLISE *IN VITRO*

A partir dos experimentos *in vitro*, os resultados seguiram por etapas de quantificação do RNA viral, depois buscamos relações da presença do vírus e o tratamento celular com inibidor/estimulador de processo autofágico no quantitativo celular, para então, demonstrar a relação vírus *versus* tratamento *versus* processos de morte celular.

Quantificamos a carga viral por meio do RNA do ZIKV no sobrenadante celular para categorizar de acordo com os grupos de tratamento, utilizando MOI de 0,1 em 0, 24 ou 48 hpi (Tabela 9). De acordo com os dados, a carga viral em 00 hpi foi maior para o grupo BLANK. Interessantemente, todos os grupos obtiveram uma diminuição da carga viral em quase metade do valor médios somente em 24 hpi, com exceção do grupo SBI, que apresentou maior carga viral do que os demais grupos nesse mesmo tempo. As maiores quantidades de RNA viral foram detectadas nos grupos DMSO[SBI], RAP, BLANK, DMSO[RAP] e PBS[CHL], por ordem decrescente, para 48 hpi. Em geral, os dados do Ct apresentaram uniformidade para todos os grupos e hpi.

Tabela 9 – Valor médio da carga viral (cópias/ μ L), quando infectadas com MOI de 0,1 do vírus Zika, por diferentes grupos de tratamentos em 00, 24 ou 48 horas pós-infecção

Grupos	Carga Viral					
	Fold charge			Ct		
	00	24	48	00	24	48
BLANK	39.040	22.999	318.082	23.9049	24.5612	21.4058
CHL	22.649	12.146	29.374	24.4770	26.9020	24.1763
PBS[CHL]	22.196	16.272	158.367	24.5226	26.9933	22.1965
SBI	24.231	34.909	22.616	24.4011	23.9558	24.4551
DMSO[SBI]	24.295	21.511	960.339	24.3685	24.5205	20.1030
RAP	29.281	27.710	769.145	24.1703	24.2398	20.5266
DMSO[RAP]	37.966	22.659	164.832	23.8537	24.4770	22.1503

BLANK: Células + meio com 2% de SBF; CHL: Células + meio com 2% de SBF + Cloroquina; PBS[CHL]: Células + meio com 2% de SBF + Cloroquina diluído em PBS; SBI: Células + meio com 2% de SBF + SBI; DMSO[SBI]: Células + meio com 2% de SBF + SBI diluído em DMSO; RAP: Células + meio com 2% de SBF + Rapamicina; DMSO[RAP]: Células + meio com 2% de SBF + Rapamicina diluída em DMSO. HPI= horas pós-infecção.

Por meio das análises estatísticas, vimos que a comparação de múltiplas variáveis do quantitativo de células autofágicas em tempo de infecção (00 ou 24 hpi) e presença/ausência de ZIKV por tratamento. Em geral, apenas os tratamentos com Rapamicina® demonstraram diferenças estatísticas significantes em ausência/presença de vírus, RAP vs. DMSO[RAP] com $p=0,0311$ (Tabela 10). Enquanto que, o parâmetro de hpi não apresentou significância ($p<0,05$). Estes dados reforçaram que os tratamentos com Rapamicina® estimularam o fenômeno de autofagia em presença de vírus independente de tempo.

Tabela 10 – Visão geral do teste paramétrico com múltiplas comparações (x1- hpi; x2- presença/ausência de vírus; x3- mediana do quantitativo celular marcado) para fenômeno de autofagia

		CHL	SBI	RAP*
x1- hpi	x2- Vírus	x3- Mediana		
00	Ausente	0,0097	0,0152	0,0000
		0,0120	0,0089	0,0103
	Presente	0,0181	0,0193	0,0080
		0,0069	0,0104	0,0000
24	Ausente	0,0000	0,0004	0,0000
		0,0022	0,0000	0,0013
	Presente	0,0000	0,0190	0,0062
		0,0000	0,0082	0,0100
		PBS[CHL]	DMSO[SBI]	DMSO[RAP]*
x1- hpi	x2- Vírus	x3- Mediana		
00	Ausente	0,0219	0,0080	0,0124
		0,0123	0,0102	0,0165
	Presente	0,0000	0,1093	0,0124
		0,0170	0,0000	0,0222
24	Ausente	0,0004	0,0006	0,0009
		0,0002	0,0000	0,0000
	Presente	0,0055	0,0030	0,0000
		0,0231	0,0099	0,0000

* $p<0,05$; parâmetro x2 (presença ou ausência de vírus) em Rapamicina®, com $p= 0,0311$.

Por outro lado, quando comparamos a mediana do quantitativo celular sob os mesmos tratamentos celulares para análise do processo de apoptose, obtivemos resultados significantes nos grupos tratados com Cloroquina® e Rapamicina®, com $p= 0,0325$ e $p= 4,81^{-08}$, respectivamente (Tabela 11). Novamente, a variável de tempo em hpi mostrou p -value menor que 0,05. Assim, notamos que os tratamentos com Cloroquina® e Rapamicina® ativam o processo apoptótico neuronal em presença de ZIKV.

Tabela 11 – Visão geral do teste paramétrico com múltiplas comparações (x1- hpi; x2- presença/ausência de vírus; x3- mediana do quantitativo celular marcado) para fenômeno de apoptose

		CHL*	SBI	RAP*
x1- hpi	x2- Vírus	x3- Mediana		
00	Ausente	0,0589	0,0404	0,1037
		0,1281	0,0488	0,1323
	Presente	0,1056	0,1562	0,0044
		0,1064	0,0297	0,0515
24	Ausente	0,1711	0,1169	0,1641
		0,4577	0,1054	0,1494
	Presente	0,0673	0,0308	0,0343
		0,0773	0,0000	0,0875
48	Ausente	0,2058	0,0990	0,0984
		0,1518	0,1418	0,1160
	Presente	0,0225	0,0356	0,1066
		0,0280	0,0573	0,0189
		PBS[CHL]*	DMSO[SBI]	DMSO[RAP]*
x1- hpi	x2- Vírus	x3- Mediana		
00	Ausente	0,0688	0,0791	0,0984
		0,0534	0,1416	0,1160
	Presente	0,1923	0,0000	0,0124
		0,0126	0,1028	0,0000
24	Ausente	0,1335	0,0729	0,1493
		0,0925	0,1038	0,1331
	Presente	0,1215	0,2106	0,0593
		0,0930	0,0000	0,0000
48	Ausente	0,0470	0,0659	0,1489
		0,1019	0,0522	0,1451
	Presente	0,0294	0,0416	0,0246
		0,0561	0,0095	0,0282

* $p < 0,05$; parâmetro x3 (mediana) em CHL vs. PBS[CHL], com $p = 0,0325$, e RAP vs. DMSO[RAP], com $p = 4,81^{-08}$.

Outro dado importante a ser reportado está no tratamento com Rapamicina®, no qual ambos os grupos RAP e DMSO[RAP] apresentaram fenômenos de autofagia e apoptose simultâneos com ZIKV, independente de tempo. Na Figura 28, exploramos esses eventos celulares sob uma análise de visual.

Por fim, observamos a existência da co-relação entre os fenômenos de morte celular a carga viral, por meio da marcação da autofagia (LC3, P62) e apoptose (AV, 7AAD) aos valores de cópias do RNA de ZIKV em 00 e 24 hpi (Figura 28). Somente o grupo PBS[CHL] demonstrou valores significantes de 0.04 e 0.01 para tempo e fenômeno de autofagia, por meio da marcação de LC3, respectivamente (Figura 29). Aos demais grupos, os resultados demonstraram que a carga de vírus não está associada a fenômenos de autofagia e/ou apoptose, muito menos, com aumento do tempo em hpi.

Figura 28 – Células infectadas dos grupos tratados com Rapamicina® e marcadas para fenômenos de autofagia (LC3 e P62) e apoptose (Anexina V e 7AAD) independente de tempo, lidas por Citometria de Fluxo e gráficos gerados pelo FlowJo

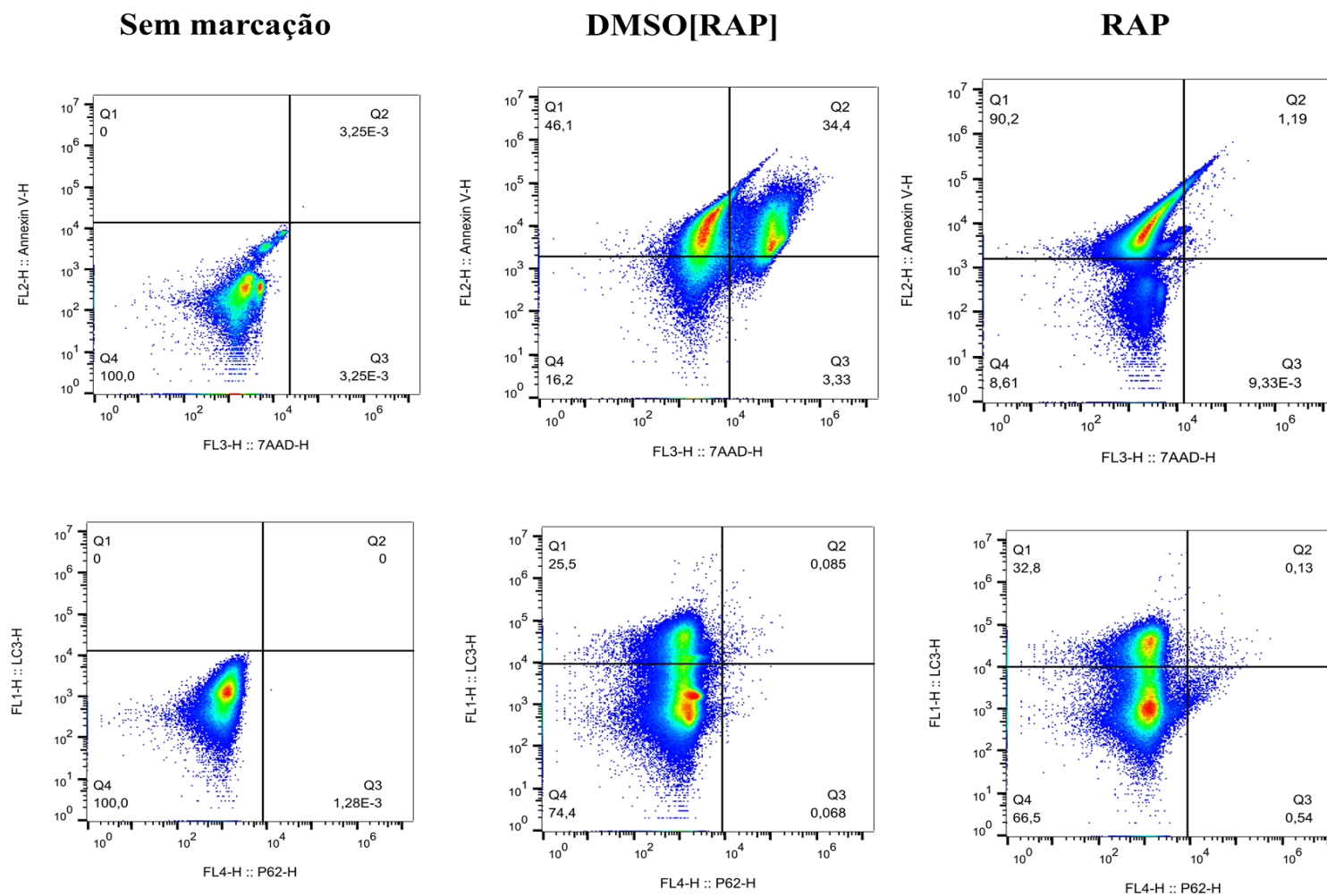
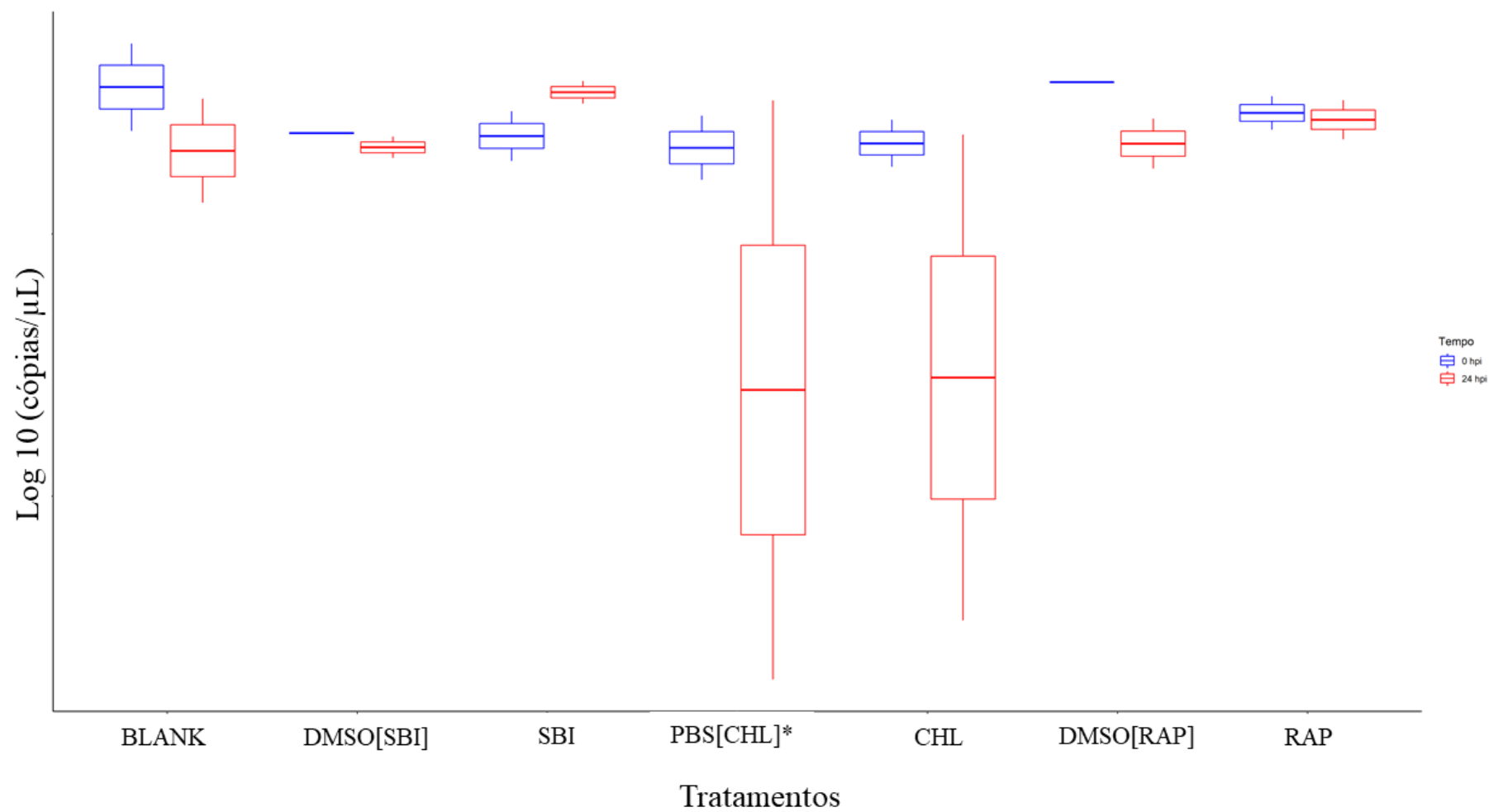
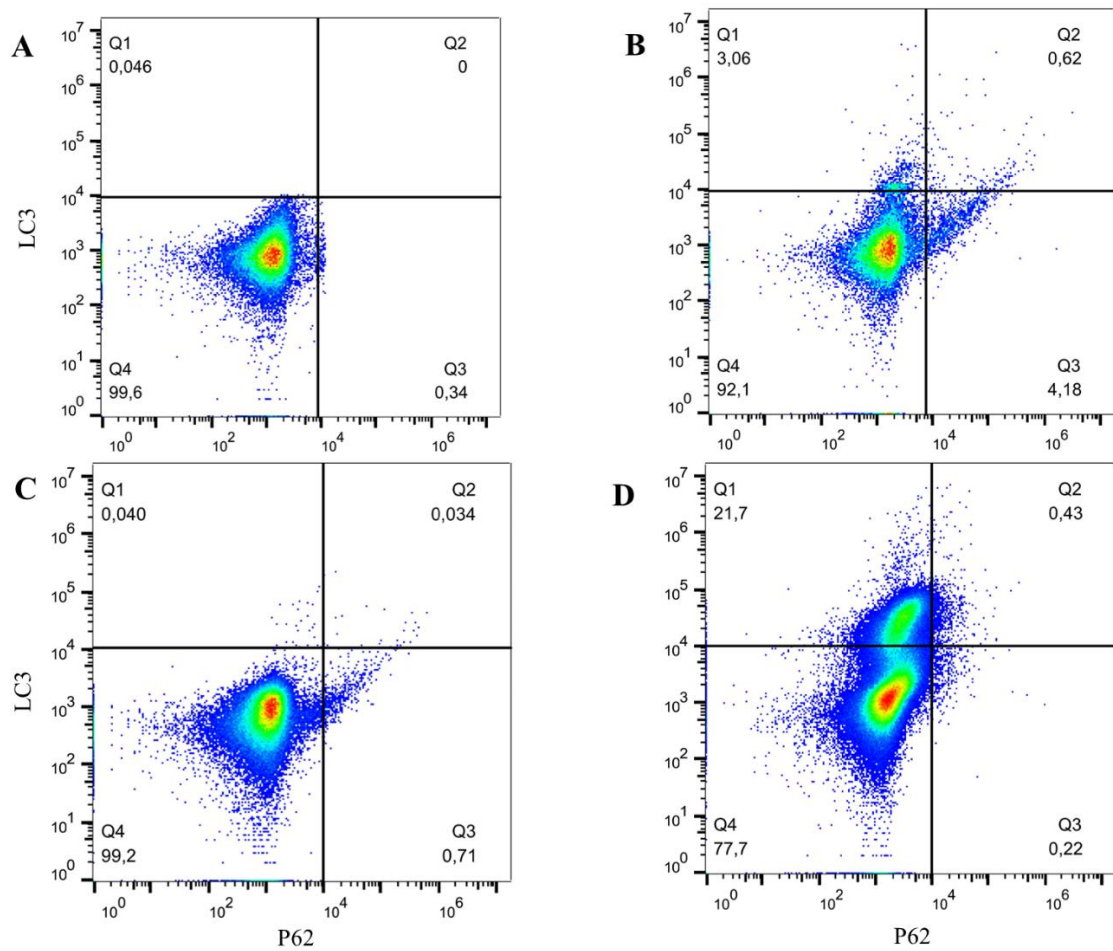


Figura 29 – Box plot com valores estatísticos em Log 10 de cópias virais do vírus Zika, por microlitro, para cada grupo de células infectadas tratadas de acordo com marcadores de apoptose e autofagia



* $p=0.04$ (tempo); $p=0.01$ (marcador celular LC3).

Figura 30 – Células do grupo PBS[CHL] em 00 ou 24 horas pós-infecção (hpi), lidas por Citometria de Fluxo e gráficos gerados pelo FlowJo



(A) Sem marcação para LC3 e P62 em 00 hpi; (B) Marcadas com ambos anticorpos para LC3 e P62 em 00 hpi; (C) Sem marcação para LC3 e P62 em 24 hpi; (D) Marcação para LC3 e P62 em 24 hpi.

6 DISCUSSÃO

Aqui, propomos experimentos *in silico* e *in vitro* afim de associar a imunopatogenicidade do ZIKV em humanos. Inicialmente, realizamos análises preditivas e simulações computacionais por ferramentas de *docking* e dinâmicas moleculares, na tentativa de buscar novos receptores de superfície celular potenciais que possam elucidar a interação vírus-célula. Em segundo momento, reproduzimos ensaios para observar a morte celular por autofagia e/ou apoptose em células neuronais infectadas, com possibilidade de associar a carga viral em diferentes tratamentos por bloqueadores/ativadores do processo autofágico.

Em nossos resultados, a proteína M do ZIKV demonstrou interações biomoleculares com os receptores Fas e TNFR2. Observamos que o acoplamento entre M e Fas alcançou um comportamento estável e contínuo, semelhante ao FasL. Por outro lado, a proteína M apresentou carência de ligações e comportamento de baixa estabilidade para TNFR1, se comparada ao TNF- α , que manifeste qualquer relevância biológica. Mesmo TNF- α tendo apresentado maior estabilidade de acoplamento do que a M com TNFR2, foram observadas interações em resíduos de aminoácidos em comum entre ambos ligantes. Por isso, sugerimos que a proteína M talvez seja um fator de acessório para ancoragem em receptores de superfície celular, como Fas e TNFR2.

Sabe-se que Fas é um representante dos receptores de morte celular programada comumente abundante em linfócitos, macrófagos e oligodendrócitos. Enquanto que FasL é expresso em, além de macrófagos, astrócitos e oligodendrócitos (VOLPE et al., 2016). O Fas induz a estimulação de vias apoptóticas pela interação com FasL através do acoplamento ao sítio de ligação, localizado nos resíduos Arg52, Lys73, Phe81 e Glu98 do Fas (STARLING et al., 1998). Aqui, a proteína M e o FasL não compartilharam ligações de hidrogênio em comum formadas com o Fas. Porém, as análises dessas revelaram que M é capaz de interagir fortemente a resíduos Phe33 e Glu91 no Fas, os quais são próximos aos locais de interação com FasL. Por isso, a proteína M de ZIKV mostrou-se capaz de poder impedir a ligação do FasL ao seu receptor cognato e a partir destas observações, acreditamos que M atua como provável antagonista bloqueador pelo Fas.

A modulação via Fas-FasL em células T e NK está envolvida na citotoxicidade celular, bem como, progressão de condições patológicas autoimunes do SNC, sendo Fas um receptor de membrana e FasL solúvel no plasma ocasionalmente (VOLPE et al., 2016). Até o momento, nenhum estudo publicado associou qualquer tipo de interação via Fas-FasL com proteínas estruturais de ZIKV. Por outro lado, Fas-FasL medeia o mecanismo de apoptose em monócitos primários humanos (TORRENTES-CARVALHO et al., 2009) e endoteliais vasculares

humanas (LIAO; XU; HUANG, 2010) infectadas pelo DENV-2, bem como, células NK também infectadas, exibem elevados níveis de RNAm do receptor Fas (MCKECHNIE et al., 2020).

TNFR2 destaca-se por ser um dos principais receptores para TNF- α que, ao formar o complexo de ligação receptor-ligante, medeia sinais pró-inflamatórios, sobrevivência ou proliferação em células endoteliais, neuronais e imunológicas (GOUGH; MYLES, 2020). Estruturalmente, a forte interação do complexo TNFR2-TNF- α é favorecida pelos resíduos Arg77 e Arg113 no TNFR2, os quais formam os sítios de ligação e fazem parte do CRD3 (MUKAI et al., 2010). Apesar da proteína M ter exibido menor estabilidade estrutural com TNFR2 do que TNF- α , em nossas simulações, ambos ligantes, endógeno e viral, compartilham ligações de hidrogênio nos resíduos Arg77 e Arg113 deste receptor. Com esses dados, hipotetizamos que a M tem potencial de se comportar como agonista competidor pelo sítio de ligação ao TNFR2.

A partir da formação do complexo TNFR2-TNF, TRAF2 é recrutada e destaca-se como a molécula central para formação das vias canônica e não-canônica para ativação de NF- κ B. Na via canônica, NF- κ B fosforilado leva a uma imediata resposta na expressão dos genes *COX-2*, *Pro-IL-1* e *Pro-IL-18* (LIU et al., 2017; GOUGH; MYLES, 2020). Por outro lado, a via não-canônica de NF- κ B promove proliferação e sobrevivência celular. E ainda, uma sinalização sinérgica pode ser relatada entre TRADD do TNFR1 e TRAF2-cIAP1/2 no TNFR2, o qual inibe via canônica e estimula a via não-canônica de NF- κ B. Portanto, a sinalização não-canônica via TNFR2 pode levar a estimulação do Complexo I do DD-DISC em TNFR1 e mediar a morte celular (SHI; SUN, 2018; GOUGH; MYLES, 2020). Entretanto, ainda não foram publicados estudos capazes de demonstrar modulações do TNFR2 com qualquer representante de *Flavivirus*.

Além disso, microambientes inflamatórios com níveis de TNF- α vem sendo associados somente a funcionalidade de TNFR1, e não ao TNFR2. Entretanto, estudos publicados recentes têm demonstrado que TNFR2 está intimamente relacionado a manutenção funcional da homeostase do SNC em neurônios, oligodendrócitos, micróglias e células T_{reg}. Sabe-se que TNF- α no SNC desencadeia mecanismos de neurodegeneração via TNFR1, como também, em neuroinflamação via TNFR2, mas permanecem escassos em detalhes (ATRETKHANY et al., 2020).

As predições no *docking* proteína-proteína e simulações em dinâmica molecular elaboradas com proteínas estruturais e não-estruturais para elucidação da interação vírus-célula, indicam resultados inéditos para estudos da imunopatogênese do ZIKV. Até o momento, ainda

não foram publicados mais achados que pudesse corroborar intimamente aos nossos dados da proteína M de ZIKV como acessório para ancoragem da partícula maturada em Fas e TNFR2, bem como, possível antagonista bloqueador e agonista competidor pelos respectivos receptores. Acima de tudo, acreditamos que mais estudos precisam ser elucidados.

Relatamos *in vitro* que as células com 24 hpi apresentaram diminuição da carga viral, exceto o grupo tratado com SBI-0206965® sem veículo, cujo qual obteve aumento de RNA viral. Enquanto que, em presença ou ausência de ZIKV, os grupos que receberam Rapamicina® apresentaram processo autofágico evidente, com ou sem veículo. Além disso, reportamos que a apoptose foi evidente nos grupos tratados apenas com Cloroquina® ou Rapamicina®. Por outro lado, células tratadas com Cloroquina® em veículo PBS foram as únicas que demonstraram relação do aumento no quantitativo viral para tempo ou início de autofagia via ativação da LC3.

Acreditamos ZIKV em 24 hpi não foi capaz de efetuar um ciclo completo de replicação, levando a diminuição na quantidade de RNA viral de 00 hpi para 24 hpi em nossos resultados. Ainda em 24 hpi, as células tratadas por SBI-0206965® podem ter acelerado o maquinário viral e conseqüentemente, a replicação de ZIKV. Enquanto que em 48 hpi, ZIKV foi capaz de realizar um ciclo completo, independente do tratamento, bem como, alcançou o nível de saturação nas células tratadas apenas com SBI-0206965®. O tratamento com Rapamicina® atingiu os resultados esperados estimulando o processo autofágico durante os experimentos, aonde foi relatado ambos fenômenos celulares de autofagia e apoptose nos grupos tratados com essa droga, na presença de ZIKV.

SBI-0206965® destaca-se como um composto antitumoral capaz de inibir a fase inicial da autofagia via ULK1/2. A Cloroquina® também representa um agente terapêutico inibidor da etapa de fusão, aonde o lisossomo se funde ao autofagossomo para formar o autolisossomo com auxílio da P62 (CHICOTE et al., 2020). De acordo com Chicote et al. (2020), SBI-0206965® e Cloroquina® apresentam alta eficiência em bloquear o processo autofágico em 12h e baixa citotoxicidade em 24 horas de exposição as drogas. Em contrapartida, a Rapamicina® é uma droga utilizada para estimular a autofagia por meio da inibição da proteína mTOR, que regula negativamente o processo autofágico (SARKAR et al., 2008).

A autofagia é uma das primeiras respostas intracelulares basais durante a invasão de *Flavivirus* na célula hospedeira. DENV e ZIKV induzem a formação de membranas no RE contendo LC3, e por meio das NS4A e NS4B, bloqueiam a sinalização Akt-mTOR (GRATTON et al., 2019). Entretanto, em células neuronais humanas, a desregulação da via Akt-mTOR gera a inibição da neurogênese e a interação NS4A/NS4B modula a conversão da LC3-I em LC3-II

durante o processo autofágico, induzindo uma autofagia eficiente para talvez favorecer seu ciclo de replicação do ZIKV com a formação de mais vesículas (LIANG et al., 2016). Além disso, ZIKV é capaz de ativar mTORC1/2 e inibir ULK1/2 durante etapas iniciais da autofagia em neurônios e células da glia entre 12 e 24 hpi (SAHOO et al., 2020). Entretanto, os experimentos de Sahoo et al. (2020) ainda demonstram que LC3 e P62 tem expressão aumentada até as 24 hpi, mas são diminuídos em 48 hpi nestes modelos celulares. Acredita-se que a hiperativação da sinalização mTOR e a baixa atividade da mTOR levam a exaustão e depleção de células neurais, sendo um mecanismo patológico que gera morte celular e pode estar associado ao neurodesenvolvimento anormal humano (TAKEI; NAWA, 2014).

Além disso, reportamos que os grupos que receberam tratamento de Cloroquina® ou Rapamicina® ativaram apoptose, mesmo um sendo inibidor e outro estimulador do processo autofágico, respectivamente, independente de tempo da infecção pelo ZIKV. Esses achados são fortificados pelo resultado obtido também dos grupos tratados com Rapamicina® na autofagia em presença de ZIKV. Concomitantemente, o tratamento de grupos infectados pelo ZIKV com Rapamicina® demonstra que a autofagia atenuada gera apoptose em células neuronais. Em contrapartida, o uso de Cloroquina® nas células infectadas mostrou ativação de morte celular por apoptose, mas não por gerou autofagia atenuada por bloqueio da P62. Acima de tudo, não foi registrado qualquer fenômeno de autofagia, com 24 hpi, e/ou apoptose, com 48 hpi, gerado pela infecção do ZIKV *in vitro* sem tratamentos com inibidor/estimulador de processo autofágico.

Por fim, as células tratadas por Cloroquina® demonstraram associação direta a estimulação do processo autofágico por meio da marcação de LC3 com um aumento do quantitativo de RNA viral. Esses dados nos levam a crer que ZIKV ativou vias de apoptose pela inibição da P62, bem como, ZIKV estimulou a autofagia por meio da via macroautofágica em células neuronais para aumentar sua carga viral, sem haver a formação do autofagolisossomo por P62 estar inibida pela Cloroquina®.

Por meio do estudo de Turpin et al. (2019), utilizando clones moleculares do ZIKV epidêmicas do Brasil e da Polinésia Francesa, não foram vistos sinais de morte celular antes das 48 hpi em células epiteliais e neurais humanas, ao contrário da MR766, que apresentou efeitos citopáticos no início das 24 hpi e consequentemente, maior agressividade *in vitro*. O autor ainda acredita que esse fenômeno de *delay* pode ser um mecanismo estratégico para ZIKV executar o ciclo de replicação completamente até atingir a saturação da célula (TURPIN et al., 2019), o que também talvez demonstrasse uma relação sobre a manipulação de ZIKV sob as vias apoptóticas. Em adição, ZIKV impede que a célula hospedeira seja estimulada por mediadores

apoptóticos, tais como TNF- α , na provável perspectiva de atrasar a morte celular (TURPIN et al., 2019). De acordo com Li et al. (2019), observou que a cepa brasileira do ZIKV apresenta baixos níveis de RNA livre durante as primeiras 24 hpi, aumentando exponencialmente até atingir 48 hpi e então, mantendo uma leve queda de metade dos níveis para 72 hpi, em células gliais.

Até agora, as infecções pelo ZIKV foram associadas a processos de morte celular, perda tecidual, inflamação generalizada e lesão neurológica em humanos (SOUSA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2018). Apesar dos esforços recentes para elucidar as bases moleculares na imunopatogênese da SGB e SCZ, a compreensão dos mecanismos moleculares que resultam em efeitos citopáticos que refletem sobre a arquitetura morfofisiológica permanecem desconhecidos. Aqui, propomos modelos *in silico* e *in vitro* nas relações vírus-célula que sugerem complexidade na imunopatogênese de ZIKV, bem como, ambos resultados apresentam dificuldade de complementação entre si para formular novas hipóteses.

Em geral, observamos que nossos dados exibiram baixa qualidade de relevância biológica para corroborar fortemente com a nossa hipótese inicial. Além disso, falhas técnicas e o período de pandemia impediram a re-execução desse experimento. De imediato, precisamos refazer a trajetória de planejamento dos ensaios *in vitro* para maiores comparações.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho sugere que a proteína M do ZIKV seja um fator acessório para ancoragem em Fas e TNFR2 das células-alvo, atuando como antagonista bloqueador pelo Fas e agonista competidor pelo TNFR2. De fato, foi reportada a ativação apoptose em células neuronais humanas, independente de tempo de infecção do ZIKV, sendo possível somente sob tratamentos com inibidor, Cloroquina®, ou estimulador, Rapamicina®, do processo autofágico. Então, concluímos que ZIKV não tem potencial *in vitro* para ativar apoptose em até 48 hpi. Além do mais, foi possível observar que a autofagia atenuada leva a ativação da morte celular por apoptose neuronal. Porém, permanece incerto por qual mecanismo molecular ocorra.

Em adição, concluímos que ZIKV é incapaz de completar seu ciclo de replicação em menos de 24 hpi *in vitro*. O ZIKV mostrou-se dependente da via macroautofágica na sinalização celular mediada por LC3, por talvez utilizar os lisossomos como local estratégico de armazenar cópias do RNA viral e provavelmente para evitar a formação do autofalisossomo.

Acreditamos que este estudo possibilite ajudar e gerar novas ideias para outras pesquisas com capacidade de focar na biologia do ZIKV, assim como de outros *Flavivirus*, afim de elucidar mecanismos que favorecem a relação vírus-célula e principalmente, suas vias moleculares envolvidas em resposta a infecção destes patógenos virais. Por isso, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreensão.

REFERÊNCIAS

- AGBULOS, D. S. et al. Zika virus: quantification, propagation, detection, and storage. **Current protocols in microbiology**, v. 43, n. 1, p. 15D. 4.1-15D. 4.16, 2016.
- AGRELLI, A. et al. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 22-29, 2019.
- _____. Mutational landscape of Zika virus strains worldwide and its structural impact on proteins. **Gene**, v. 708, p. 57-62, 2019.
- AGUIAR, R. S. et al. Molecular alterations in the extracellular matrix in the brains of newborns with congenital Zika syndrome. **Science Signaling**, v. 13, n. 635, 2020.
- ALMEIDA, R. N. et al. The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 1006, 2020.
- ALONSO-PALOMARES, L. A. et al. Molecular basis for Arbovirus transmission by Aedes aegypti mosquitoes. **Intervirology**, v. 61, n. 6, p. 255-264, 2018.
- ANAYA, J. M. et al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia. **Journal of autoimmunity**, v. 77, p. 123-138, 2017.
- BENITO, G. R. G.; GRIPSRUD, G. The expansion of foreign direct investments: discrete rational location choices or a cultural learning process?. **Journal of International Business Studies**, v. 23, n. 3, p. 461-476, 1992.
- ASSIL, S. et al. Plasmacytoid dendritic cells and infected cells form an interferogenic synapse required for antiviral responses. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 5, p. 730-745. e6, 2019.
- ATRETKHANY, K. S. N. et al. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 107, n. 6, p. 893-905, 2020.
- AUBRY, M. et al. Zika virus seroprevalence, French polynesia, 2014–2015. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 4, p. 669, 2017.
- AYALA-NUNEZ, N. V. et al. Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- BARROWS, N. J. et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. **Chemical reviews**, v. 118, n. 8, p. 4448-4482, 2018.
- BARZILAI, L. P.; SCHRAGO, C. G. The range of sampling times affects Zika virus evolutionary rates and divergence times. **Archives of virology**, v. 164, n. 12, p. 3027-3034, 2019.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

BOS, S. et al. The envelope residues E152/156/158 of Zika virus influence the early stages of virus infection in human cells. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1444, 2019.

BOYER, S. et al. An overview of mosquito vectors of Zika virus. **Microbes and infection**, v. 20, n. 11-12, p. 646-660, 2018.

BRANSCHÄDEL, M. et al. Dual function of cysteine rich domain (CRD) 1 of TNF receptor type 1: conformational stabilization of CRD2 and control of receptor responsiveness. **Cellular signalling**, v. 22, n. 3, p. 404-414, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiológicas infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Vol 50, Marc 2019. Disponível em <{HYPERLINK=<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-001.pdf>}>. Acesso em novembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Situação epidemiológica da infecção pelo vírus Zika no Brasil, de 2015 a 2017. Vol 49, Nov 2018. Disponível em <{HYPERLINK=<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>}>. Acesso em Outubro de 2019.

BÜTTNER, C. et al. Zika virus-mediated death of hippocampal neurons is independent from maturation state. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 389, 2019.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016.

CARBAUGH, D. L.; LAZEAR, H. M. Flavivirus envelope protein glycosylation: impacts on viral infection and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 94, n. 11, 2020.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125-2132, 2016.

CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of autoimmunity**, v. 68, p. 1-13, 2016.

CHICOTE, J. et al. Cell Death Triggered by the Autophagy Inhibitory Drug 3-Methyladenine in Growing Conditions Proceeds with DNA Damage. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

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.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267-271, 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.
- DUARTE, F. O. M. et al. Notificación de defectos congénitos por brote del virus del Zika en Colombia, 2015-2017. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 43, 2019.
- 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.
- DUONG, V.; DUSSART, P.; BUCHY, P. Zika virus in Asia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 121-128, 2017.
- FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.
- GARCÍA, C. C. et al. Cellular Organelles Reorganization During Zika Virus Infection of Human Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1558, 2020.
- GAVEGNANO, C. et al. Jak inhibitors modulate production of replication-competent Zika virus in human Hofbauer, trophoblasts, and neuroblastoma cells. **Pathogens & immunity**, v. 2, n. 2, p. 199, 2017.
- GOLUBEVA, V. A. et al. Network of interactions between ZIKA virus non-structural proteins and human host proteins. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 153, 2020.
- GOODFELLOW, F. T. et al. Strain-dependent consequences of zika virus infection and differential impact on neural development. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 550, 2018.
- GOUGH, P.; MYLES, I. A. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020.
- GRATTON, R. et al. Autophagy in Zika virus infection: a possible therapeutic target to counteract viral replication. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, p. 1048, 2019.
- HACKETT, B. A.; CHERRY, S. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 16, p. 4246-4251, 2018.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.
- HERRADA, C. A. et al. Advances in Diagnostic methods for Zika Virus infection. **Journal of medical devices**, v. 12, n. 4, 2018.
- HEUKELBACH, J. et al. Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 02, p. 116-120, 2016.

- HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: an update. **Acta tropica**, v. 190, p. 99-111, 2019.
- HILLS, S. L.; FISCHER, M.; PETERSEN, L. R. Epidemiology of Zika virus infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S868-S874, 2017.
- HOU, W. et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. **Gene**, v. 628, p. 117-128, 2017.
- HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 22, 2019.
- HUANG, Y. J. S. et al. Flavivirus-mosquito interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703-4730, 2014.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know?. **Journal of basic microbiology**, v. 58, n. 1, p. 3-16, 2018.
- JORGACHEVSKI, J. et al. ZIKV strains differentially affect survival of human fetal astrocytes versus neurons and traffic of ZIKV-laden endocytotic compartments. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.
- JORGE, F. A. et al. Evolutions and upcoming on Zika virus diagnosis through an outbreak: A systematic review. **Reviews in medical virology**, v. 30, n. 3, p. e2105, 2020.
- KAKSONEN, M.; ROUX, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 313, 2018.
- KAKSONEN, M.; ROUX, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 313, 2018.
- KAWAI, Y. et al. Increased growth ability and pathogenicity of American-and Pacific-subtype Zika virus (ZIKV) strains compared with a Southeast Asian-subtype ZIKV strain. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007387, 2019.
- KAZMI, S. S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2020.
- KIM, J. et al. Insights into ZIKV-mediated innate immune responses in human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 2, p. 391-399, 2019.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425-428, 2016.
- KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 255, 2017.
- KÜMMERER, B. M. Establishment and application of flavivirus replicons. **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**, p. 165-173, 2018.

- 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, 2008.
- LANDRY, M. L.; ST. GEORGE, K. Laboratory diagnosis of Zika virus infection. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 141, n. 1, p. 60-67, 2017.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- LEDUR, P. F. et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- LEE, I. et al. Probing molecular insights into Zika virus–host interactions. **Viruses**, v. 10, n. 5, p. 233, 2018.
- LI, G. et al. The roles of prM-E proteins in historical and epidemic Zika virus-mediated infection and neurocytotoxicity. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 157, 2019.
- _____. Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 3, p. E376-E385, 2017.
- LI, H. et al. Zika virus protease cleavage of host protein septin-2 mediates mitotic defects in neural progenitors. **Neuron**, v. 101, n. 6, p. 1089-1098. e4, 2019.
- LI, J.; YIN, Q.; WU, H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. **Advances in immunology**, v. 119, p. 135-153, 2013.
- LI, X.; HE, S.; MA, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. **Molecular cancer**, v. 19, n. 1, p. 12, 2020.
- LIANG, Q. 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**, v. 19, n. 5, p. 663-671, 2016.
- LIAO, H.; XU, J.; HUANG, J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells. **Journal of medical virology**, v. 82, n. 8, p. 1392-1399, 2010.
- LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 50, 36, 2016.
- LIU, J. et al. Zika virus envelope protein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via an intrinsic cell death signaling pathway in neuroendocrine PC12 cells. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 9, p. 1099, 2018.
- LIU, Y. et al. Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses—Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 6, 2016.
- 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.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411-415, 1969.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411-415, 1969.

MATUSALI, G. et al. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 10, p. 4697-4710, 2018.

MCKECHNIE, J. L. et al. Mass Cytometry Analysis of the NK Cell Receptor–Ligand Repertoire Reveals Unique Differences between Dengue-Infected Children and Adults. **ImmunoHorizons**, v. 4, n. 10, p. 634-647, 2020.

MÉNDEZ, N. et al. Zika virus disease, microcephaly and Guillain-Barré syndrome in Colombia: epidemiological situation during 21 months of the Zika virus outbreak, 2015–2017. **Archives of Public Health**, v. 75, n. 1, p. 1-11, 2017.

MERTENS, E. et al. Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1b. **Virology**, v. 399, n. 1, p. 176-185, 2010.

MINER, J. J.; DIAMOND, Michael S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017.

MUKAI, Y. et al. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. **Science signaling**, v. 3, n. 148, p. ra83-ra83, 2010.

MUSSO, D. et al. Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. e172-e182, 2018.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125, 2018.

NG, I. H. W. et al. Zika virus NS5 forms supramolecular nuclear bodies that sequester importin- α and modulate the host Immune and pro-inflammatory response in neuronal cells. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 6, p. 932-948, 2019.

NG, W. C. et al. The 5' and 3' untranslated regions of the flaviviral genome. **Viruses**, v. 9, n. 6, p. 137, 2017.

NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell biology and toxicology**, v. 36, n. 2, p. 145-164, 2020.

NOGUCHI, K. K. et al. Zika virus infection in the developing mouse produces dramatically different neuropathology dependent on viral strain. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 5, p. 1145-1161, 2020.

NUNES, M. L. et al. Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria (Versão em português)**, v. 92, n. 3, p. 230-240, 2016.

OLIVEIRA, E. R. A.; ALENCASTRO, R. B.; HORTA, B. A. C. New insights into flavivirus biology: the influence of pH over interactions between prM and E proteins. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 31, n. 11, p. 1009-1019, 2017.

ÖSTERLUND, P. et al. Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

PAGANI, I. et al. Human endometrial stromal cells are highly permissive to productive infection by Zika virus. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

PAHO. Pan American Health Organization. Zika-Epidemiological Report: The United States of America. Disponível em <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-phe-zika-situation-report-usa.pdf>>, Acesso em dezembro 2019.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PETTERSSON, J. H. O. et al. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018.

POSEN, H. J. et al. Epidemiology of Zika virus, 1947–2007. **BMJ global health**, v. 1, n. 2, 2016.

RABELO, K. et al. Zika virus infects human placental mast cells and the HMC-1 cell line, and triggers degranulation, cytokine release and ultrastructural changes. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 975, 2020.

SILVA, S. S. et al. Efficiencies and kinetics of infection in different cell types/lines by African and Asian strains of Zika virus. **Journal of medical virology**, v. 91, n. 2, p. 179-189, 2019.

RASHID, M. et al. Zika virus dysregulates human Sertoli cell proteins involved in spermatogenesis with little effect on tight junctions. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008335, 2020.

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.

REEMST, K. et al. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. **Frontiers in human neuroscience**, v. 10, p. 566, 2016.

RELICH, R. F.; LOEFFELHOLZ, M. Zika virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 37, n. 2, p. 253-267, 2017.

RINKENBERGER, N.; SCHOGGINS, J. W. Comparative analysis of viral entry for Asian and African lineages of Zika virus. **Virology**, v. 533, p. 59-67, 2019.

ROPIDI, M. I. M. et al. Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. **Journal of biomedical science**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2020.

SAHOO, B. R. et al. Mechanistic Target of Rapamycin Signaling Activation Antagonizes Autophagy To Facilitate Zika Virus Replication. **Journal of Virology**, v. 94, n. 22, 2020.

SALVESEN VON ESSEN, B. et al. Preventing Sexual Transmission of Zika virus Infection during Pregnancy, Puerto Rico, USA, 2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2115-2119, 2019.

SÁNCHEZ-SAN MARTÍN, C. et al. Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

SARKAR, S. et al. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 46-56, 2009.

SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Reviews in medical virology**, v. 29, n. 4, p. e2050, 2019.

SHI, J. H.; SUN, S. C. Tumor necrosis factor receptor-associated factor regulation of nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1849, 2018.

SHI, Y. et al. Structures of zika virus E & NS1: relations with virus infection and host immune responses. **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**, p. 77-87, 2018.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural biology of the Zika virus. **Trends in biochemical sciences**, v. 42, n. 6, p. 443-456, 2017.

SHRIVASTAVA, S. et al. Whole genome sequencing, variant analysis, phylogenetics, and deep sequencing of Zika virus strains. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

SILVA, I. R. F. et al. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. **JAMA neurology**, v. 74, n. 10, p. 1190-1198, 2017.

SIMMONDS, P. et al. Ictv Report C. 2017. **ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. J Gen Virol**, v. 98, p. 2-3.

SIMONIN, Y. et al. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005821, 2017.

SLOMNICKI, L. P. et al. Ribosomal stress and Tp53-mediated neuronal apoptosis in response to capsid protein of the Zika virus. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

SOUSA, J. R. et al. Correlation between apoptosis and in situ immune response in fatal cases of microcephaly caused by Zika virus. **The American journal of pathology**, v. 188, n. 11, p. 2644-2652, 2018.

STARLING, G. C. et al. Analysis of the ligand binding site in Fas (CD95) by site-directed mutagenesis and comparison with TNFR and CD40. **Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 3723-3726, 1998.

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

- SUBISSI, L. et al. Zika virus infection during pregnancy and effects on early childhood development, French Polynesia, 2013–2016. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 10, p. 1850, 2018.
- TAKEI, N.; NAWA, H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 7, p. 28, 2014.
- TAN, Z. et al. ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2018.
- TANG, C. et al. Autophagy in kidney homeostasis and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 9, p. 489-508, 2020.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, 2017.
- TORRENTES-CARVALHO, A. et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1091-1099, 2009.
- TURPIN, J. et al. The Zika virus delays cell death through the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1338, 2019.
- VALADÃO, A. L. C.; AGUIAR, R. S.; ARRUDA, L. B. Interplay between inflammation and cellular stress triggered by flaviviridae viruses. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1233, 2016.
- VAN DOORN, P. A. Diagnosis, treatment and prognosis of Guillain-Barré syndrome (GBS). **La Presse Médicale**, v. 42, n. 6, p. e193-e201, 2013.
- VENANCIO, F. A. et al. Congenital Zika Syndrome in a Brazil-Paraguay-Bolivia border region: Clinical features of cases diagnosed between 2015 and 2018. **PloS one**, v. 14, n. 10, p. e0223408, 2019.
- VILLAMIL-GOMEZ, W. E. et al. Guillain-Barré syndrome during the Zika virus outbreak in Sucre, Colombia, 2016. **Travel medicine and infectious disease**, v. 16, p. 62-63, 2017.
- VOLPE, E. et al. Fas–fas ligand: Checkpoint of t cell functions in multiple sclerosis. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 382, 2016.
- WAJANT, H.; SIEGMUND, D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 91, 2019.
- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering, design and selection**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.
- WATRIN, L. et al. Guillain–Barré syndrome (42 cases) occurring during a Zika virus outbreak in French Polynesia. **Medicine**, v. 95, n. 14, 2016.
- MABLESON, H. E. et al. Neglected zoonotic diseases—the long and winding road to advocacy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 6, p. e2800, 2014.
- WEN, D. et al. N-glycosylation of viral E protein is the determinant for vector midgut invasion by flaviviruses. **MBio**, v. 9, n. 1, 2018.

WHO – World Health Organization (2016). Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus. Acesso em outubro 2020.

_____. Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Geneva: World Health Organization. Disponível em <{HYPERLINK=<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>>}. Acesso em Novembro de 2019.

XING, H. et al. Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. **Virus research**, v. 275, p. 197793, 2020.

YAMADA, A. et al. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 403, 2017.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W174-W181, 2015.

YANG, K. H.; NARAYAN, R. J. Analytical methods for detection of Zika virus. **MRS Communications**, v. 7, n. 2, p. 121-130, 2017.

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.

YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 933-936, 2017.

ZAIDI, M. B. et al. Serological tests reveal significant cross-reactive human antibody responses to Zika and Dengue viruses in the Mexican population. **Acta tropica**, v. 201, p. 105201, 2020.

ZAMBRANO, H. et al. High incidence of Zika virus infection detected in plasma and cervical cytology specimens from pregnant women in Guayaquil, Ecuador. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. e12630, 2017.

ZHANG, F.; REN, S.; ZUO, Y. DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin: C-type lectins for infection. **International reviews of immunology**, v. 33, n. 1, p. 54-66, 2014.

APÊNDICE A – In Vitro Zika Vírus Infection Of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays

Coautoria de artigo publicado em revista internacional (IF: 4.1)



Review

In Vitro Zika Virus Infection of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays

Rossella Gratton ^{1,2,*}, Paola Maura Tricarico ¹, Almerinda Agrelli ^{3,4},
Heverton Valentim Colaço da Silva ^{3,4}, Lucas Coêlho Bernardo ^{3,4}, Sergio Crovella ^{1,5},
Antonio Victor Campos Coelho ⁶, Ronald Rodrigues de Moura ^{4,5} and
Lucas André Cavalcanti Brandão ^{3,4}

¹ Department of Advanced Translational Microbiology, Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34137 Trieste, Italy; tricaricopa@gmail.com (P.M.T.); crovelser@gmail.com (S.C.)

² Department of Medical, Surgical and Health Sciences, University of Trieste, Strada di Fiume 447, 34129 Trieste, Italy

³ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil; almerindaapimentel@hotmail.com (A.A.); neto_pe6@live.com (H.V.C.d.S.); lucascoelhobernardo.lb@gmail.com (L.C.B.); lucabrand@gmail.com (L.A.C.B.)

⁴ Department of Pathology-Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil; ronaldmoura1989@gmail.com

⁵ Department of Genetics-Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil

⁶ Department of Molecular Biology-Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I-Lot.-Cidade Universitária, 58051-900 João Pessoa, Brazil; antoniocampos@dbm.ufpb.br

* Correspondence: rossella.gratton@gmail.com; Tel.: +39-040-378-5422

Received: 7 January 2020; Accepted: 14 February 2020; Published: 17 February 2020



Abstract: The Zika virus (ZIKV) is an emergent arthropod-borne virus (arbovirus) responsible for congenital Zika syndrome (CZS) and a range of other congenital malformations. Evidence shows that ZIKV infects human neural progenitor cells (hNPCs) in the fetal brain, prompting inflammation and tissue damage/loss. Despite recent advances, little is known about the pathways involved in CZS pathogenesis. We performed a meta-analysis, gene ontology (GO), and pathway analysis of whole transcriptome studies with the aim of clarifying the genes and pathways potentially altered during hNPCs infection with ZIKV. We selected three studies (17 samples of infected hNPCs compared to hNPCs uninfected controls) through a systematic search of the Gene Expression Omnibus (GEO) database. The raw reads were trimmed, counted, and normalized. Next, we performed a rank product meta-analysis to detect consistently differentially expressed genes (DEGs) in these independent experiments. We detected 13 statistically significant DEGs. GO ontology and reactome analysis showed an enrichment of interferon, pro-inflammatory, and chemokines signaling and apoptosis pathways in ZIKV-infected cells. Moreover, we detected three possible new candidate genes involved in hNPCs infection: *APOL6*, *XAF1*, and *TNFRSF1*. Our results confirm that interferon (IFN) signaling dominates the ZIKV response, and that a crucial contribution is given by apoptotic pathways, which might elicit the CZS phenotype.

Keywords: congenital Zika syndrome; transcriptomics; genomics; apoptosis; gene ontology; pathway analysis; stem cells

1. Introduction

The Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus), member of the *Flaviviridae* family and of the *Flavivirus* genus, transmitted by *Aedes* genus mosquitoes [1]. In 2015, during the outbreak in Brazil, ZIKV was correlated for the first time to neonatal microcephaly [2] and to a variety of other congenital malformations, especially of neurological origin, collectively known as congenital Zika syndrome (CZS) [3].

CZS is characterized by a spectrum of congenital malformations associated with ZIKV infection during embryonic development [4]. The most commonly reported neurological feature of CZS is microcephaly, a condition characterized by a head circumference ≥ 2 standard deviations below the mean for sex and gestational age at birth, although other neurological abnormalities, including brainstem dysfunction, absence of swallowing reflex, and polymalformative syndromes, may also be present [5]. General features (redundant scalp skin, anasarca, low birth weight, polyhydramnios, and arthrogryposis) and ophthalmological defects (intraocular calcifications, cataract, asymmetrical eye sizes, macular atrophy, optic nerve hypoplasia, iris coloboma, and lens subluxation) have also been reported [6–8].

The human central nervous system (CNS) development begins during the third week of embryogenesis [9]. The embryonic brain is basically composed of human neural progenitor cells (hNPCs), progenitor cells that give rise to all of the glial and neuronal cell types that populate the CNS; therefore, the onset of pathogenic processes might cause neuroinflammation and the secretion of immunoregulatory molecules [10]. As a result, these events may trigger cell death mechanisms, leading to an impairment of hNPCs proliferation, growth, and differentiation, and consequently to a defective brain development [11].

Several studies demonstrated that ZIKV infects hNPCs in the fetal brain, prompting inflammation and tissue damage and loss [12–15]. Despite recent advances in the characterization of the impact of ZIKV infection on embryonic CNS development, it is still necessary to identify which pathways in hNPCs are involved during these pathogenic mechanisms. This gap of knowledge is clearly restrictive for the development of therapeutic approaches that could prevent the severe clinical consequences of the infection.

Transcriptional profiling has provided remarkable opportunities for understanding the relationship between cellular function and metabolic pathways, as well as to define the possible implications of genetic variability and environmental conditions in many tissues and organisms [16]. RNA-sequencing (RNA-Seq) has been widely used over the last decade and has become the main option for these studies [17,18].

In this work, we performed a meta-analysis of whole transcriptome studies, aiming to clarify which genes and cellular networks were up- or downregulated during ZIKV infection in hNPCs. Next, we assessed a comprehensive pathway analysis to predict how the modulation of these genes could affect the outcome of the disease.

2. Materials and Methods

2.1. Study Search

We used the SRAdB package [19] for R software version 3.6.1 [20] to search for RNA-Seq experiments deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database related to ZIKV infection in hNPCs that matched the following criteria: only whole transcriptome studies; experiments carried out in patients' cells (ex vivo) or human cell lines (in vitro); and availability of the raw data (.fastq files) for each sample. The following search terms were used: "ZIKV RNA-Seq" and "ZIKV transcriptome" including studies from 19 July 2015 to 19 July 2019.

2.2. RNA-Seq Data Collection, Processing, and Analysis

For all analyzed samples, Raw .fastq files were downloaded and re-processed using the same pipeline analysis. For this purpose, Trimmomatic v0.39 [21] was used to trim adapters and to exclude reads counting less than 25 bases. Then, the remaining reads were mapped on the National Center for Biotechnology (NCBI) human GRCh38 reference genome and sorted by coordinates using STAR aligner [22]. Aligned reads were imported into R software version 3.6.1 [20], together with a .gtf annotation file from the reference genome, using packages *Rsamtools* [23], *GenomicFeatures*, and *GenomicAlignments* [24].

The gene counts were normalized and filtered in order to remove low-expressed genes (i.e., genes expressed in less than three samples and less than two copies). Differentially expressed genes (DEGs) for each study were re-calculated using a Wald test with correction for multiple tests implemented in the *DESeq2* package [25]. Genes with $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ and false discovery rate (FDR)-adjusted p -values < 0.05 were considered to be statistically significant.

2.3. Meta-Analysis

The normalized and filtered gene expression dataset, together with the samples' information relative to the type of treatment (ZIKV-infected or control) and the team that performed the study (Zhang et al., McGrath et al., or Caires-Júnior et al.) were included in the meta-analysis using the *RankProd* package for R software version 3.6.1 [20]. Briefly, the package performs the rank product (RP) and rank sum tests, non-parametric tests that detect consistently differentially expressed genes in independent and replicated experiments. The test ranks expression fold-changes calculated in a pairwise manner among several experimental replicates. Under the null hypothesis (no differentially expressed genes), it “is extremely unlikely to find the same gene at the top of each list [of ranked fold changes among experiments] just by chance” [26,27]. We adopted the meta-analysis methodology derived from a previously published study, in which a gene ontology enrichment analysis was also included (see the next section) [28].

2.4. Gene Ontology Enrichment Analysis

In parallel with the identification of differentially expressed genes via meta-analysis, we performed a gene ontology enrichment analysis by employing the *GOexpress* package [29], also suitable for R software version 3.6.1 [20]. Briefly, the package scores each gene feature (through a random forest statistical framework) on “its ability to classify samples from different treatments separately, before summarizing this information at the ontology level” [29]. Then, the package queries the ranked genes in the Ensembl gene ontology database and configures the package to assess the statistical significance of the gene ontology ranking via permutation-based calculation of p -values (100,000 permutations), representing the probability of seeing at least five genes out of the total number of genes in the list attributed to a particular gene ontology term [30,31]. Then, the genes were ranked from the lowest to highest p -value below the limit of $p < 0.05$.

2.5. Reactome Pathway Analysis

For each independent study and for the pooled dataset in the meta-analysis, we conducted a pathway analysis, based on the REACTOME database, of the statistically significant DEGs using the *ReactomePA* package [20]. Also, in this case, only the results with false discovery rate (FDR)-adjusted p -values < 0.05 were considered significant.

3. Results

The search strategy retrieved 30 studies. Three people (R.R.M., H.V.C.S., and L.C.B.) independently reviewed the search hits, from which 10 studies were excluded because only viral genomes were sequenced; four were excluded since they were studies performed in mice; three experiments were

eliminated since they involved other animals (mice and *Aedes aegypti* mosquitoes); one study was removed since it was relative to the sequencing of the Chikungunya virus genome; six studies involving other human cell types and three studies based on CNS organoids were also excluded as they contemplated the usage of other cell types beside hNPCs. Finally, the three reviewers agreed that three studies matched the fixed criteria (Table 1) [32–34].

Table 1. Detailed information regarding the three selected studies that matched the study criteria. DEGs: differentially expressed genes, hiPSCs (human-induced pluripotent stem cells), MOI (multiplicity of infection), NPCs (neural progenitor cells), RNA-Seq (RNA sequencing), ZIKV (Zika virus).

SRA	Title	Samples	Replicates	Main Results
SRP073493	Molecular Signatures Associated with ZIKV Exposure in Human Cortical Neural Progenitors [32]	Three infected (two with African and one with Asian lineage); two non-infected	Two per sample	The RNA-Seq extraction was gone in 56 hpi for African lineage and 64 hpi for Asian lineage. MOI of 0.2 and 0.4. DEGs include <i>TP53</i> .
SRP096367	Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection [33]	Three infected with Asian or African lineage; three non-infected	Three per sample	Usage of isolates from Mexico (Asian lineage), Cambodia (Asian lineage), and Senegal strains (African lineage). Following 120 hpi to RNA-Seq extraction. MOI of 0.1 and 1. The DEGs found were <i>FAS</i> , <i>SOX1</i> , and <i>TUBB3</i> .
SRP114529	RNA-seq of hiPSCs-Derived NPCs from Three Pairs of Dizygotic Discordant Twins for Congenital Zika Syndrome [34]	Three infected with Asian lineage; three non-infected	One per sample	Brazilian strain (Asian lineage) used at a MOI of 0.01 and 0.1. RNA-Seq extracted 96 hpi. Identified DEGs included <i>DEPDC5</i> , <i>GPR108</i> , <i>MICAL3</i> , <i>OR12D2</i> , <i>OR4K5</i> , <i>PHF2</i> , <i>SLC6A18</i> , and <i>TTC16</i> .

The first study, from Zhang et al. (SRADB id: SRP073493, GSE id: GSE80434) [32], analyzed the differences between ZIKV and Dengue virus (DENV) infection in hNPCs. In the selected research, hNPCs were infected with both African (ZIKVM) and Asian (ZIKVC) lineages to then compare the levels of transcriptional changes, gene function, and protein interactions among the DEGs. We focused our attention only on the comparisons between ZIKVM versus mock treatment and ZIKVC versus mock treatment. Their study highlighted 1345 DEGs between ZIKVM and its mock group and 601 DEGs for the ZIKVC versus mock group comparison.

The work of McGrath et al. [33] (SRADB id: SRP096367, GSE id: GSE93385) was the second study to be included. It comprised the analysis of hNPC samples derived from three deceased children. Whole transcriptome profiles were compared between infected and non-infected cells of each patient separately. As a result, they detected eight upregulated and four downregulated genes, found to be shared between the samples.

The third study, conducted by Caires-Júnior et al. [34] (SRADB id: SRP114529, GSE id: GSE102128) described the performance of an RNA-Seq experiment on cells derived from three pairs of discordant phenotypes of CZS dizygotic twins. According to their results, authors identified 64 DEGs, and specifically the *DDIT4L* gene, which plays a crucial role in the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway and emerged as the most relevant one.

Since each study possesses its own approach in terms of handling and statistical procedures of RNA-Seq data, we reprocessed the reads using the same protocols for all samples and performed a meta-analysis. The normalization of expression data resulted in 29,318 features present in all 17 samples. Among those, we identified 13 upregulated genes in virus-infected cells through the rank product method with a percentage of false prediction, $pfp < 0.05$ and $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ (Table 2).

Table 2. Meta-analysis results of three RNA-Seq assays involving human neural stem cells experimentally infected in vitro with Zika virus when compared to control cells, ranked by lowest *p*-values corrected by the percentage of false prediction, pfp (rank product test).

Gene	Rank Product	Fold Change (Control/ZIKV-Infected)	log2 (Fold Change)	<i>p</i> -Value	pfp
<i>OAS1</i>	334.5	0.228	−2.1329	1.874×10^{-9}	0.0001
<i>CXCL10</i>	350.9	0.3021	−1.7269	2.664×10^{-9}	0.00004
<i>OASL</i>	840.8	0.3739	−1.4193	0.000001	0.0088
<i>CCL5</i>	880.8	0.2667	−1.9067	0.000002	0.0095
<i>CXCL11</i>	997.5	0.1634	−2.6135	0.000004	0.0153
<i>TNFRSF1</i>	1001	0.2218	−2.1727	0.000004	0.0137
<i>IFIH1</i>	1085	0.2048	−2.2877	0.000006	0.0205
<i>OAS3</i>	1150	0.3442	−1.5387	0.000009	0.0266
<i>CHI3L1</i>	1158	0.3843	−1.3797	0.00001	0.0254
<i>NKX3-1</i>	1164	0.3466	−1.5287	0.00001	0.0241
<i>APOL6</i>	1203	0.1532	−2.7065	0.00001	0.0273
<i>XAF1</i>	1251	0.283	−1.8213	0.00002	0.0323
<i>HOXA2</i>	1314	0.4441	−1.1710	0.00002	0.0383

The gene ontology analysis identified 847 enriched terms. Due to the stem cell nature of the cells used in the examined experiments, as expected, most of the top-ranked terms included events representative of cell cycle progression (“mitotic spindle midzone assembly”, rank #1, $p < 0.00001$) and cell differentiation (“nervous system development”, #12, $p < 0.00001$, “multicellular organism development”, #15, $p < 0.00001$; “cell differentiation”, #39, $p = 0.00021$). We then selected 20 terms possibly related to ZIKV-infection and response (Table 3), including for example: “response to virus” (#49, $p = 0.00033$), “apoptotic process” (#57, $p = 0.00042$), “viral process” (#64, $p = 0.0005$), “positive regulation of neuron death” (#132, $p = 0.00239$), and “regulation of inflammatory response” (#142, $p = 0.00266$). The complete list of enriched GO terms can be found in the Supplementary Table S1.

From the 13 DEGs that reached our $|\log_2(\text{fold change})|$ threshold, reactome analysis returned 12 statistically significant pathways in which these genes are involved (Table 4). Briefly, these pathways are related to interferon signaling and response, as well as to interleukin-10, chemokines, and other receptor signaling.

Table 3. List of 20 gene ontology (GO) terms that were enriched in the meta-analysis of three RNA-Seq assays involving human neural stem cells that were experimentally infected in vitro with Zika virus when compared to control cells (false discovery rate (FDR)-adjusted *p*-values). The complete list of all 847 terms can be found in Supplementary Table S1.

Rank	GO Term	Genes in GO Term	Genes of GO Term Present in Data	Adjusted <i>p</i> -Value	GO Term Description
23	GO:0043066	541	526	0.00071	Negative regulation of apoptotic process
49	GO:0009615	109	109	0.00570	Response to virus
57	GO:0006915	693	666	0.00617	Apoptotic process
64	GO:0016032	476	460	0.00662	Viral process
69	GO:0033209	118	117	0.00749	Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway
125	GO:1902237	11	11	0.01385	Positive regulation of endoplasmic reticulum stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway
132	GO:1901216	41	41	0.01523	Positive regulation of neuron death
142	GO:0050727	81	81	0.01576	Regulation of inflammatory response
152	GO:0006954	386	372	0.01612	Inflammatory response
257	GO:0006959	56	56	0.02419	Humoral immune response
282	GO:0043065	375	360	0.02500	Positive regulation of apoptotic process
328	GO:0051607	201	195	0.02596	Defense response to virus
546	GO:0042771	29	29	0.03671	Intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator
570	GO:0034612	32	32	0.03800	Response to tumor necrosis factor
576	GO:0002523	9	9	0.03854	Leukocyte migration involved in inflammatory response
639	GO:0097194	18	18	0.04256	Execution phase of apoptosis
641	GO:0045089	25	25	0.04259	Positive regulation of innate immune response
683	GO:0002741	8	8	0.04391	Positive regulation of cytokine secretion involved in immune response
704	GO:0002437	15	15	0.04585	Inflammatory response to antigenic stimulus
805	GO:0002827	9	9	0.04832	Positive regulation of T-helper 1 type immune response

Table 4. A list of “reactome” pathways that were enriched in the meta-analysis of three RNA-Seq assays involving human neural stem cells experimentally infected in vitro with Zika virus when compared to control cells. FADD/RIP-1 (fas-associated death domain and receptor interacting protein 1), GPCR (G protein-coupled receptor), IFN (interferon), IRF (interferon regulatory factor), NF- κ B (nuclear factor kappa B), TRAF3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 3).

Reactome ID	Description	<i>p</i> -Value	Adjusted <i>p</i> -Value	Gene Symbols
R-HSA-1169410	Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes	6.50×10^{-5}	0.0005	<i>OAS1/OASL/OAS3</i>
R-HSA-373076	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	0.0039	0.0135	<i>CXCL10/CCL5/CXCL11</i>
R-HSA-375276	Peptide ligand-binding receptors	0.0008	0.0039	<i>CXCL10/CCL5/CXCL11</i>
R-HSA-380108	Chemokine receptors bind chemokines	1.39×10^{-5}	0.0002	<i>CXCL10/CCL5/CXCL11</i>
R-HSA-418594	G alpha (i) signaling events	0.0073	0.0228	<i>CXCL10/CCL5/CXCL11</i>
R-HSA-500792	GPCR ligand binding	0.0101	0.0282	<i>CXCL10/CCL5/CXCL11</i>
R-HSA-6783783	Interleukin-10 signaling	0.0010	0.0041	<i>CXCL10/CCL5</i>
R-HSA-877300	Interferon gamma signaling	9.87×10^{-5}	0.0005	<i>OAS1/OASL/OAS3</i>
R-HSA-909733	Interferon alpha/beta signaling	5.21×10^{-7}	1.46×10^{-5}	<i>OAS1/OASL/OAS3/XAF1</i>
R-HSA-913531	Interferon Signaling	3.56×10^{-5}	0.0003	<i>OAS1/OASL/OAS3/XAF1</i>
R-HSA-918233	TRAF3-dependent IRF activation pathway	0.0144	0.0336	<i>IFIH1</i>
R-HSA-933543	NF- κ B activation through FADD/RIP-1 pathway mediated by caspase-8 and -10	0.0127	0.0315	<i>IFIH1</i>

4. Discussion

We searched for studies involving hNPCs transcriptome analysis in response to ZIKV infection. We included three available studies and analyzed the gene expression patterns using a meta-analysis with the rank product method. Using a different approach, we detected 13 statistically significant DEGs found to be upregulated in hNPCs infected by ZIKV. No downregulated gene was observed as statistically associated with hNPCs infected by ZIKV. Our goal was to identify the expression pattern during ZIKV infection in hNPCs, primarily in order to highlight potential molecules that could be used as an antiviral barrier, namely restriction factors, and identify which molecules are released during the antiviral response.

Differences amongst the number and the identity of differentially expressed genes found in our meta-analysis, and in the selected studies, individually rely on three main factors. The first aspect to be considered is that each study has its own peculiarities in terms of the analyzed samples and conditions of infection, as highlighted in Table 1. The second aspect depends on the fact that the studies did not apply the same method for the quantitative evaluation of each mRNA. Specifically, the study of Zhang et al. [32] used fragments per kilobase million (FPKM) measurements for mRNA counting and then applied gamma-Poisson normalization, while we opted for the usage of a simple count followed by the application of the gamma-Poisson normalization. Third, the experimental design among the studies was clearly different. For instance, in the work conducted by McGrath et al. [33], they assessed a pair-wise comparison between infected and non-infected cells from each evaluated brain sample followed by the application of a Venn diagram to verify the differences (or resemblances) between infected and non-infected samples as a whole. Furthermore, the statistical procedures carried out by Caires-Junior et al. [34] were very similar to the ones we employed in our study, although it is important to note that the contexts of application were different since we were assessing them in a meta-analysis context, whereas they made a single study.

Being that the sampled cells were hNPCs, between the identified DEGs, three are known to be involved in tissue development: the NK3 homeobox 1 (*NKX3-1*) and homeobox A2 (*HOXA2*), which encode for homeobox-containing transcription factors and promote animal morphogenesis and tissue differentiation [35,36], and chitinase-3-like protein 1 (*CHI3L1*), which codes for a chitinase-like protein that lost the capability for chitin cleavage, but retained the carbohydrate-binding affinity, and is thought to regulate tissue remodeling and angiogenesis [37].

2'-5'-Oligoadenylate synthetase 1 and 3 (*OAS1* and *OAS3*) and 2'-5'-oligoadenylate synthetase like (*OASL*) are related to antiviral responses and were detected as being upregulated in their ZIKV-infected counterparts. They are interferon-inducible genes that bind to double-stranded RNA (dsRNA) and single-stranded RNA (ssRNA) viral genomes and activate the RNase L degradation pathway of viral and cellular RNA, therefore arresting viral production [38]. A recent study demonstrated that while ZIKV ssRNA genome is susceptible to RNase L activity, the virus otherwise efficiently evades the enzymatic activity due to its unique replication factories in the endoplasmic reticulum, which confers a higher resistance to host viral sensors when compared to other *Flaviviruses*, such as DENV, that employ similar assembly strategies [39].

However, the most intriguing evidence is represented by the upregulation of interferon-inducible genes, such as interferon induced with helicase C domain 1 (*IFIH1*) and apolipoprotein L6 (*APOL6*) genes. *IFIH1*, also known as melanoma differentiation-associated protein 5 (*MDA5*), encodes for a pattern recognition receptor that, along with the DDX58 (RIG1) protein, is able to bind dsRNA and ssRNA derived from other *Flaviviruses*, such as DENV, and elicits innate immune responses through type I interferon (IFN-1) production [40]. Moreover, this gene has already been seen to be upregulated in skin cells during ZIKV infection [41].

APOL6 has been reported to not only promote antiviral responses against some viruses, such as picornaviruses, enteroviruses, and respiratory syncytial virus [42,43], but also to possess pro-apoptotic properties [44]. We could not find any other independent evidence relating the expression of this gene in the context of ZIKV infection.

It is important to note that in our analysis, we identified two other DEGs not yet independently associated with ZIKV infection, to our knowledge: X-linked inhibitor of apoptosis protein associated factor 1 (*XAF1*) and tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (*TNFRSF1*). *XAF1* is involved in the apoptotic route and it encodes for a protein acting as an antagonist of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), therefore also exerting pro-apoptotic properties. Its expression is also induced by interferon (IFN) signaling and is thought to function as a tumor suppressor [45]. We could not ascertain other studies showing *XAF1* association with ZIKV infection. *TNFRSF1* encodes for a widely expressed protein, which is the main receptor involved in mediating soluble TNF α -induced signaling, therefore exerting a pivotal role in regulating pro-inflammatory and immune responses [46]. *TNFRSF1* has not been reported to be involved with ZIKV infection; nevertheless, other studies highlight its role in the immune defense in the gut mucosa [47].

As previously described in the text, the majority of the identified DEGs mediate antiviral intracellular pathways. However, besides *TNFRSF1*, some other genes involved in inflammatory and immune responses were also upregulated in ZIKV-infected hNPCs: C-C motif chemokine ligand 5 (*CCL5*) and C-X-C motif chemokine ligand 10 and 11 (*CXCL10* and *CXCL11*) [48]. *CCL5*, *CXCL10*, and *CXCL11* have already been shown to be expressed in ZIKV-infected skin cells [41].

Integrating our results in the context of neurogenesis, we suppose that the presence of ZIKV in hNPCs is sensed by interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1), which acts as a restriction viral factor, enabling the cell to activate type 1 interferon apoptosis and inflammatory pathways, as suggested by reactome analysis. Furthermore, the activation of inflammatory processes might increase the production of cytokines and chemokines (*CXCL10* and *CXCL11*) that may play a key role during neurogenesis by regulating the expression of developmental genes. Thus, some neurological CZS symptoms may be due to the development of an interfering inflammatory response during neurogenesis [49].

5. Conclusions

RNA-Seq has contributed to increase the knowledge relative to the biological and cellular processes involved during infections, especially in the context of an emergent pathogen, such as ZIKV. Meta-analysis of RNA-Seq assays increases the statistical power of samples and we applied this method for re-examining past evidence to better understand the pathogenesis of CZS. The results of our GO enrichment and reactome analysis seem to support the assumption that the cellular antiviral pathways activated in response to ZIKV infection could be responsible for an impaired cellular neurogenesis. As mentioned above, other studies investigating ZIKV infection also support the biological significance of our meta-analysis findings. Moreover, we detected three possible novel candidate genes involved during this antiviral response: *APOL6*, *XAF1*, and *TNFRSF1*. Finally, we confirmed that IFN signaling dominates the cellular response against ZIKV infection, and that under these conditions, an important contribution is given by apoptotic pathways that might elicit the CZS phenotype (Figure 1).

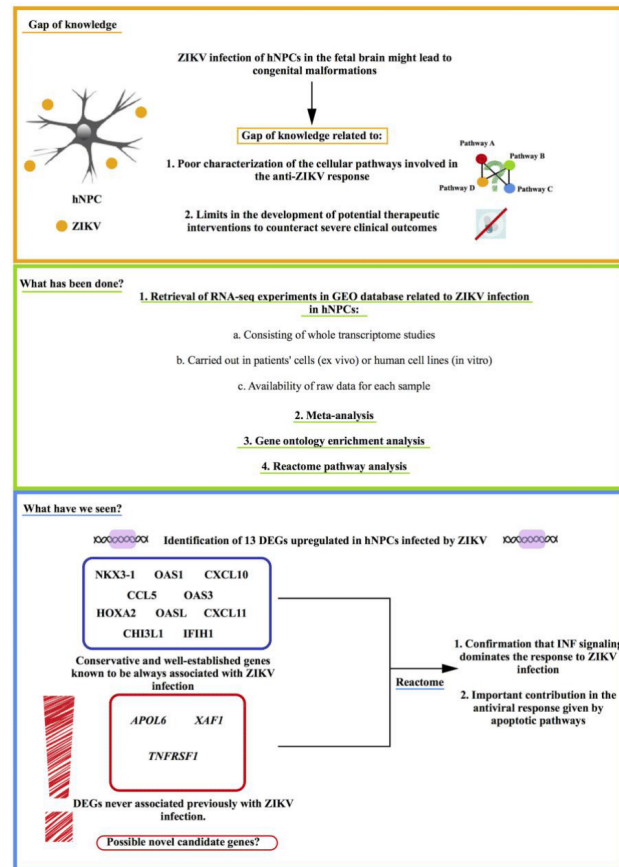


Figure 1. Meta-analysis of RNA-Seq assays for the characterization of congenital Zika syndrome (CZS). ZIKV can infect hNPCs in the fetal brain, possibly leading to congenital malformations. Despite recent advances, the characterization of the main cellular pathways involved in the anti-ZIKV response are yet not fully understood and clearly constitute a limitation for the development of therapeutic approaches that could prevent the severe clinical consequences of the infection. By performing a meta-analysis, gene ontology, and reactome pathway analysis of whole transcriptome studies, we aimed at clarifying the genes and pathways that are potentially altered during hNPCs infection with ZIKV. Our results led to the identification of 13 DEGs found to be upregulated in hNPCs infected by ZIKV. Specifically, we detected three possible new candidate genes, never previously associated to ZIKV-infection, expressed during the antiviral response in infected hPNCs: *APOL6*, *XAF1*, and *TNFRSF1*. Finally, we have confirmed that INF signaling dominates the response against ZIKV infection and that an important contribution is given by apoptotic pathways that might elicit the CZS phenotype.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/270/s1>, Table S1: A complete list of all 847 GO terms that were enriched in the meta-analysis of three RNA-Seq assays involving human neural stem cells.

Author Contributions: Conceptualization, A.A., R.R.d.M., and L.A.C.B.; methodology, R.R.d.M., H.V.C.d.S., and L.C.B.; formal analysis, R.R.d.M. and A.V.C.C.; writing—original draft preparation, A.A., R.R.d.M., and A.V.C.C.; writing—review and editing, R.G. and P.M.T.; supervision, L.A.C.B.; funding acquisition, R.G., P.M.T., and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), grant number 88881.130808/2016.1, and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), from the Brazilian public notice *Chamada 14/2016—Prevenção e Combate ao vírus Zika*, grant number 440371/2016-3, both granted to S.C. and 308540/2017-4 granted to L.A.C.B.

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

References

1. Azar, S.R.; Weaver, S.C. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? *Viruses* **2019**, *11*, 867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Schuler-Faccini, L.; Ribeiro, E.M.; Feitosa, I.M.; Horovitz, D.D.; Cavalcanti, D.P.; Pessoa, A.; Doriqui, M.J.; Neri, J.I.; Neto, J.M.; Wanderley, H.Y.; et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly—Brazil, 2015. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 59–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Miranda-Filho Dde, B.; Martelli, C.M.; Ximenes, R.A.; Araujo, T.V.; Rocha, M.A.; Ramos, R.C.; Dhalia, R.; Franca, R.F.; Marques Junior, E.T.; Rodrigues, L.C. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *Am. J. Public Health* **2016**, *106*, 598–600. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Moore, C.A.; Staples, J.E.; Dobyns, W.B.; Pessoa, A.; Ventura, C.V.; Fonseca, E.B.; Ribeiro, E.M.; Ventura, L.O.; Neto, N.N.; Arena, J.F.; et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr.* **2017**, *171*, 288–295. [\[CrossRef\]](#)
5. Chan, J.F.; Choi, G.K.; Yip, C.C.; Cheng, V.C.; Yuen, K.Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J. Infect.* **2016**, *72*, 507–524. [\[CrossRef\]](#)
6. Ventura, C.V.; Maia, M.; Ventura, B.V.; Linden, V.V.; Araujo, E.B.; Ramos, R.C.; Rocha, M.A.; Carvalho, M.D.; Belfort, R., Jr.; Ventura, L.O. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq. Bras. Ophthalmol.* **2016**, *79*, 1–3. [\[CrossRef\]](#)
7. De Paula Freitas, B.; de Oliveira Dias, J.R.; Prazeres, J.; Sacramento, G.A.; Ko, A.I.; Maia, M.; Belfort, R., Jr. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol.* **2016**, *134*, 529–535. [\[CrossRef\]](#)
8. Ventura, C.V.; Maia, M.; Bravo-Filho, V.; Gois, A.L.; Belfort, R., Jr. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* **2016**, *387*, 228. [\[CrossRef\]](#)
9. O’Rahilly, R.; Muller, F. Developmental stages in human embryos: Revised and new measurements. *Cells Tissues Org.* **2010**, *192*, 73–84. [\[CrossRef\]](#)
10. Martinez-Cerdeno, V.; Noctor, S.C. Neural Progenitor Cell Terminology. *Front. Neuroanat.* **2018**, *12*, 104. [\[CrossRef\]](#)
11. Hammack, C.; Ogden, S.C.; Madden, J.C., Jr.; Medina, A.; Xu, C.; Phillips, E.; Son, Y.; Cone, A.; Giovinnazzi, S.; Didier, R.A.; et al. Zika Virus Infection Induces DNA Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00638–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Tang, H.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Wen, Z.; Qian, X.; Li, Y.; Yao, B.; Shin, J.; Zhang, F.; Lee, E.M.; et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 587–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Siddique, R.; Liu, Y.; Nabi, G.; Sajjad, W.; Xue, M.; Khan, S. Zika Virus Potentiates the Development of Neurological Defects and Microcephaly: Challenges and Control Strategies. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Rosa-Fernandes, L.; Cugola, F.R.; Russo, F.B.; Kawahara, R.; de Melo Freire, C.C.; Leite, P.E.C.; Bassi Stern, A.C.; Angeli, C.B.; de Oliveira, D.B.L.; Melo, S.R.; et al. Zika Virus Impairs Neurogenesis and Synaptogenesis Pathways in Human Neural Stem Cells and Neurons. *Front. Cell Neurosci.* **2019**, *13*, 64. [\[CrossRef\]](#)
15. Lima, M.C.; de Mendonca, L.R.; Rezende, A.M.; Carrera, R.M.; Anibal-Silva, C.E.; Demers, M.; D’Aiuto, L.; Wood, J.; Chowdari, K.V.; Griffiths, M.; et al. The Transcriptional and Protein Profile From Human Infected Neuroprogenitor Cells Is Strongly Correlated to Zika Virus Microcephaly Cytokines Phenotype Evidencing a Persistent Inflammation in the CNS. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1928. [\[CrossRef\]](#)

16. Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 57–63. [\[CrossRef\]](#)
17. Costa-Silva, J.; Domingues, D.; Lopes, F.M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0190152. [\[CrossRef\]](#)
18. Wang, B.; Kumar, V.; Olson, A.; Ware, D. Reviving the Transcriptome Studies: An Insight Into the Emergence of Single-Molecule Transcriptome Sequencing. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 384. [\[CrossRef\]](#)
19. Zhu, Y.; Stephens, R.M.; Meltzer, P.S.; Davis, S.R. SRADB: Query and use public next-generation sequencing data from within R. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*, 19. [\[CrossRef\]](#)
20. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online: <http://www.r-project.org/> (accessed on 3 July 2019).
21. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [\[CrossRef\]](#)
22. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Morgan, M.; Pagès, H.; Obenchain, V.; Hayden, N. Rsamtools: Binary alignment (BAM), FASTA, variant call (BCF), and tabix file import. *R Package Vers.* **2016**, *1*, 677–689.
24. Lawrence, M.; Huber, W.; Pages, H.; Aboyoun, P.; Carlson, M.; Gentleman, R.; Morgan, M.T.; Carey, V.J. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [\[CrossRef\]](#)
26. Hong, F.; Breitling, R.; McEntee, C.W.; Wittner, B.S.; Nemhauser, J.L.; Chory, J. RankProd: A bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 2825–2827. [\[CrossRef\]](#)
27. Del Carratore, F.; Jankevics, A.; Eisinga, R.; Heskes, T.; Hong, F.; Breitling, R. RankProd 2.0: A refactored bioconductor package for detecting differentially expressed features in molecular profiling datasets. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2774–2775. [\[CrossRef\]](#)
28. Lee, S.Y.; Park, Y.K.; Yoon, C.H.; Kim, K.; Kim, K.C. Meta-analysis of gene expression profiles in long-term non-progressors infected with HIV-1. *BMC Med. Genomics* **2019**, *12*, 3. [\[CrossRef\]](#)
29. Rue-Albrecht, K. GOexpress: Visualise Microarray and RNAseq Data Using Gene Ontology Annotations. R Package Version 1.18.0. Available online: <https://github.com/kevinrue/GOexpress> (accessed on 7 January 2020).
30. Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 25–29. [\[CrossRef\]](#)
31. The Gene Ontology. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D330–D338. [\[CrossRef\]](#)
32. Zhang, F.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Cheng, Y.; Lee, E.M.; Wen, Z.; Qian, X.; Nguyen, H.N.; Li, Y.; Yao, B.; et al. Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8610–8620. [\[CrossRef\]](#)
33. 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.; et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 715–727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Caires-Junior, L.C.; Goulart, E.; Melo, U.S.; Araujo, B.H.S.; Alvizi, L.; Soares-Schanoski, A.; de Oliveira, D.F.; Kobayashi, G.S.; Griesi-Oliveira, K.; Musso, C.M.; et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 475. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Shen, M.M.; Abate-Shen, C. Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev. Dyn.* **2003**, *228*, 767–778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Mallo, M.; Alonso, C.R. The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* **2013**, *140*, 3951–3963. [\[CrossRef\]](#)
37. Coffman, F.D. Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1): A putative disease marker at the interface of proteomics and glycomics. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2008**, *45*, 531–562. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

38. Kristiansen, H.; Gad, H.H.; Eskildsen-Larsen, S.; Despres, P.; Hartmann, R. The oligoadenylate synthetase family: An ancient protein family with multiple antiviral activities. *J. Interferon Cytokine Res.* **2011**, *31*, 41–47. [\[CrossRef\]](#)
39. Whelan, J.N.; Li, Y.; Silverman, R.H.; Weiss, S.R. Zika Virus Production Is Resistant to RNase L Antiviral Activity. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00313–19. [\[CrossRef\]](#)
40. Urcuqui-Inchima, S.; Cabrera, J.; Haenni, A.L. Interplay between dengue virus and Toll-like receptors, RIG-I/MDA5 and microRNAs: Implications for pathogenesis. *Antivir. Res.* **2017**, *147*, 47–57. [\[CrossRef\]](#)
41. Hamel, R.; Dejarnac, O.; Wichit, S.; Ekchariyawat, P.; Neyret, A.; Luplertlop, N.; Perera-Lecoin, M.; Surasombatpattana, P.; Talignani, L.; Thomas, F.; et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8880–8896. [\[CrossRef\]](#)
42. Schoggins, J.W.; Wilson, S.J.; Panis, M.; Murphy, M.Y.; Jones, C.T.; Bieniasz, P.; Rice, C.M. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **2011**, *472*, 481–485. [\[CrossRef\]](#)
43. Schoggins, J.W.; MacDuff, D.A.; Imanaka, N.; Gainey, M.D.; Shrestha, B.; Eitson, J.L.; Mar, K.B.; Richardson, R.B.; Ratushny, A.V.; Litvak, V.; et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* **2014**, *505*, 691–695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Liu, Z.; Lu, H.; Jiang, Z.; Pastuszyn, A.; Hu, C.A. Apolipoprotein I6, a novel proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein, induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **2005**, *3*, 21–31. [\[PubMed\]](#)
45. Plenchette, S.; Cheung, H.H.; Fong, W.G.; LaCasse, E.C.; Korneluk, R.G. The role of XAF1 in cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2007**, *8*, 469–476. [\[PubMed\]](#)
46. Siebert, S.; Fielding, C.A.; Williams, B.D.; Brennan, P. Mutation of the extracellular domain of tumor necrosis factor receptor 1 causes reduce NF-kappaB activation due to decreased surface expression. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5193–5198. [\[CrossRef\]](#)
47. Shui, J.W.; Kronenberg, M. HVEM is a TNF Receptor with Multiple Regulatory Roles in the Mucosal Immune System. *Immune Netw.* **2014**, *14*, 67–72. [\[CrossRef\]](#)
48. Commins, S.P.; Borish, L.; Steinke, J.W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S53–S72. [\[CrossRef\]](#)
49. Morimoto, K.; Nakajima, K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 916. [\[CrossRef\]](#)



© 2020 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/>).

APÊNDICE B – *IN SILICO* EVALUATION OF ZIKA VIRUS STRUTURAL PROTEINS E AND M WITH TNF RECEPTORS

Resumo simples apresentado no XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul.

IN SILICO EVALUATION OF ZIKA VIRUS STRUTURAL PROTEINS E AND M WITH TNF RECEPTORS

Lucas Coêlho Bernardo, Ronald Rodrigues de Moura, Almerinda Agrelli, Lucas André Cavalcanti Brandão

Abstract

Zika virus (ZIKV) is an emergent arbovirus of the *Flavivirus* genus, *Flaviviridae* family, that exhibit Envelope (E) and Membrane (M) structural proteins in mature viral particles envelope. Protein E is the largest viral surface protein and is responsible for binding and fusion processes. Protein M anchors protein E in the lipid bilayer of the virion. The entry mechanism of ZIKV on host cells is mediated by clathrin-mediated endocytosis, through interactions between viral proteins and cell receptors, such as C-type lectin and phosphatidylserine receptors. TNF receptors (TNFR) are a superfamily of transmembrane proteins involved in signal transduction pathways against viral and bacterial pathogens that activate inflammatory responses and cell death by apoptosis. In the context, apoptosis has been associated with tissue injury mechanisms during ZIKV immunopathogenesis. However, little is known about the ability of the ZIKV proteins to interact with cell death receptors. Here we aimed to evaluate the interactions between ZIKV proteins E and M with TNF receptors (TNFR1, TNFR2, FAS), using molecular docking and dynamics. Firstly, cell death receptors [TNFR1 (PDB ID: 1EXT); TNFR2 (PDB ID: 3ALQ); FAS (PDB ID: 3THM)], its endogenous ligands [TNF (PDB ID: 1TNF); FASL (PDB ID: 4MSV)] and ZIKV E and M protein structures (PDB ID: 5IZ7) were downloaded from Protein Data Bank (PDB). Then, we performed molecular protein-protein docking using ClusPro 2.0 server. LigPlot⁺ was used to verify hydrogen bounds in the complexes. Molecular dynamics was performed using GROMACS. Docking analysis showed that all viral proteins (E-M, E and M) have bind to the FAS and TNFR1 receptors and these binding exhibited less energy than with endogenous ligands. Therefore, ZIKV proteins showed high affinity binding for the FAS and TNFR1 and may act as a competitive inhibitor for FASL and TNF. Considering TNFR2, none of the viral proteins demonstrated minor weighted score when compared with the TNF ligand. Furthermore, only protein M presented hydrogen bonds in the same site on TNF and FASL ligands. Molecular dynamics demonstrated that the FAS-M complex exhibited stability starting from 10 ns, as well as for FAS-FASL complex. ZIKV protein M has showed to be as stable as FASL when binding FAS receptor. Moreover, SASA and Rg were agreeable in both simulations. TNFR1-M and TNFR2-M complexes did not exhibited stability during the simulations. These results suggest that protein M may be a putative ligand and/or a competitor antagonist for the active site of TNFR1, TNFR2 and FAS receptors. The other ligands (E and E-M) did not bind in the active site of the FAS, TNFR1 and TNFR2. *In vitro* studies are needed to better evaluate these interactions.

Keywords: Bioinformatics, Molecular Dynamics, Protein-protein docking, Virus-cell interactions, ZIKV.

ANEXO A – DOCKING MOLECULAR

FAS-FASL			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	135	Center	-826.4
		Lowest Energy	-898.2
1	129	Center	-810.5
		Lowest Energy	-903.6
2	122	Center	-853.7
		Lowest Energy	-884.3
3	30	Center	-792.6
		Lowest Energy	-869.5
4	28	Center	-886.8
		Lowest Energy	-895.0
5	27	Center	-773.1
		Lowest Energy	-851.2
6	26	Center	-769.5
		Lowest Energy	-888.4
7	23	Center	-855.5
		Lowest Energy	-855.5
8	23	Center	-851.3
		Lowest Energy	-899.8
9	20	Center	-844.0
		Lowest Energy	-844.0
10	19	Center	-792.3
		Lowest Energy	-845.6
11	19	Center	-772.9
		Lowest Energy	-824.3
12	17	Center	-856.9
		Lowest Energy	-856.9
13	16	Center	-878.0

		Lowest Energy	-878.0
14	15	Center	-990.9
		Lowest Energy	-990.9
15	15	Center	-847.1
		Lowest Energy	-847.1
16	15	Center	-817.2
		Lowest Energy	-818.7
17	14	Center	-789.3
		Lowest Energy	-863.7
18	13	Center	-822.5
		Lowest Energy	-822.5
19	12	Center	-912.6
		Lowest Energy	-912.6
20	12	Center	-888.1
		Lowest Energy	-888.1
21	12	Center	-875.4
		Lowest Energy	-875.4
22	12	Center	-870.0
		Lowest Energy	-870.0
23	12	Center	-798.0
		Lowest Energy	-833.8
24	11	Center	-870.2
		Lowest Energy	-870.2
25	10	Center	-791.1
		Lowest Energy	-837.1
26	10	Center	-781.2
		Lowest Energy	-842.4
27	8	Center	-792.2
		Lowest Energy	-834.9
28	6	Center	-785.9
		Lowest Energy	-788.2

TNFR1-TNFALFA			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	42	Center	-1188.6
		Lowest Energy	-1300.7
1	41	Center	-801.2
		Lowest Energy	-814.8
2	40	Center	-792.3
		Lowest Energy	-792.3
3	39	Center	-723.1
		Lowest Energy	-808.7
4	38	Center	-847.7
		Lowest Energy	-1187.6
5	37	Center	-799.1
		Lowest Energy	-799.1
6	35	Center	-756.3
		Lowest Energy	-922.4
7	35	Center	-891.8
		Lowest Energy	-1267.3
8	33	Center	-756.3
		Lowest Energy	-776.1
9	29	Center	-753.9
		Lowest Energy	-802.0
10	28	Center	-757.1
		Lowest Energy	-793.5
11	24	Center	-821.3
		Lowest Energy	-821.3
12	23	Center	-728.4
		Lowest Energy	-956.8
13	22	Center	-678.2
		Lowest Energy	-869.7
14	22	Center	-704.0
		Lowest Energy	-911.8
15	22	Center	-780.9
		Lowest Energy	-780.9
16	21	Center	-837.0
		Lowest Energy	-862.0
17	21	Center	-682.8
		Lowest Energy	-750.3
18	20	Center	-701.2
		Lowest Energy	-783.8
19	18	Center	-765.2
		Lowest Energy	-765.2

20	16	Center	-732.7
		Lowest Energy	-774.4
21	15	Center	-676.6
		Lowest Energy	-749.8
22	14	Center	-709.0
		Lowest Energy	-743.8
23	13	Center	-721.4
		Lowest Energy	-809.2
24	13	Center	-855.0
		Lowest Energy	-855.0
25	12	Center	-807.6
		Lowest Energy	-807.6
26	11	Center	-734.7
		Lowest Energy	-886.8
27	11	Center	-709.0
		Lowest Energy	-748.1

TNFR2-TNFALFA			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	79	Center	-833.9
		Lowest Energy	-1305.3
1	51	Center	-1536.3
		Lowest Energy	-1831.9
2	49	Center	-1331.8
		Lowest Energy	-1480.3
3	48	Center	-942.8
		Lowest Energy	-1323.4
4	47	Center	-878.6
		Lowest Energy	-1128.2
5	45	Center	-1410.6
		Lowest Energy	-1839.4
6	42	Center	-1316.0
		Lowest Energy	-1400.0
7	41	Center	-1460.7
		Lowest Energy	-1776.0
8	38	Center	-1479.5
		Lowest Energy	-1507.8
9	28	Center	-930.2
		Lowest Energy	-1479.0
10	25	Center	-851.8
		Lowest Energy	-1053.1

11	23	Center	-1216.0
		Lowest Energy	-1362.0
12	17	Center	-815.2
		Lowest Energy	-1004.4
13	15	Center	-846.1
		Lowest Energy	-1410.7
14	15	Center	-892.9
		Lowest Energy	-1095.3
15	15	Center	-861.5
		Lowest Energy	-997.4
16	14	Center	-967.2
		Lowest Energy	-1042.6
17	14	Center	-989.4
		Lowest Energy	-1055.3
18	13	Center	-844.8
		Lowest Energy	-1094.1
19	12	Center	-962.0
		Lowest Energy	-962.0
20	11	Center	-837.3
		Lowest Energy	-1164.2
21	11	Center	-846.1
		Lowest Energy	-901.4
22	10	Center	-946.3
		Lowest Energy	-946.3
23	10	Center	-848.9
		Lowest Energy	-1002.7
24	9	Center	-905.1
		Lowest Energy	-1208.1
25	9	Center	-795.6
		Lowest Energy	-905.8
26	8	Center	-798.3
		Lowest Energy	-1082.0
27	8	Center	-812.5
		Lowest Energy	-987.8
28	8	Center	-823.9
		Lowest Energy	-974.8
29	6	Center	-890.6
		Lowest Energy	-1218.0

FAS-EM			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	40	Center	-1244.4
		Lowest Energy	-1304.8
1	35	Center	-1271.4
		Lowest Energy	-1271.4
2	31	Center	-1121.8
		Lowest Energy	-1176.1
3	28	Center	-1313.6
		Lowest Energy	-1313.6
4	25	Center	-1098.8
		Lowest Energy	-1367.5
5	25	Center	-1559.3
		Lowest Energy	-1559.3
6	23	Center	-1299.6
		Lowest Energy	-1299.6
7	22	Center	-1109.8
		Lowest Energy	-1141.5
8	22	Center	-1100.2
		Lowest Energy	-1160.4
9	20	Center	-1081.7
		Lowest Energy	-1081.7
10	20	Center	-1062.4
		Lowest Energy	-1132.2
11	19	Center	-1112.0
		Lowest Energy	-1145.8
12	17	Center	-1226.6
		Lowest Energy	-1226.6
13	17	Center	-1144.9
		Lowest Energy	-1144.9

14	16	Center	-1019.0
		Lowest Energy	-1127.2
15	15	Center	-1207.5
		Lowest Energy	-1207.5
16	15	Center	-1191.5
		Lowest Energy	-1191.5
17	15	Center	-1153.6
		Lowest Energy	-1192.4
18	14	Center	-1219.8
		Lowest Energy	-1219.8
19	13	Center	-1060.0
		Lowest Energy	-1060.2
20	13	Center	-1100.5
		Lowest Energy	-1100.5
21	13	Center	-1079.3
		Lowest Energy	-1079.3
22	13	Center	-1035.5
		Lowest Energy	-1181.0
23	12	Center	-1088.4
		Lowest Energy	-1155.6
24	11	Center	-1016.8
		Lowest Energy	-1158.8
25	11	Center	-1098.4
		Lowest Energy	-1098.4
26	11	Center	-1061.0
		Lowest Energy	-1101.8
27	10	Center	-1159.9
		Lowest Energy	-1159.9
28	10	Center	-1219.6
		Lowest Energy	-1219.6
29	10	Center	-1181.5

		Lowest Energy	-1181.5
--	--	---------------	---------

TNFR1-EM			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	40	Center	-1150.3
		Lowest Energy	-1193.3
1	40	Center	-1141.1
		Lowest Energy	-1280.7
2	25	Center	-1033.2
		Lowest Energy	-1287.5
3	24	Center	-1148.1
		Lowest Energy	-1195.4
4	21	Center	-1005.5
		Lowest Energy	-1306.4
5	19	Center	-1001.1
		Lowest Energy	-1201.6
6	18	Center	-1180.6
		Lowest Energy	-1284.4
7	18	Center	-1078.3
		Lowest Energy	-1122.5
8	17	Center	-1039.4
		Lowest Energy	-1146.1
9	17	Center	-1233.7
		Lowest Energy	-1360.9
10	17	Center	-997.8
		Lowest Energy	-1133.4
11	17	Center	-1165.9
		Lowest Energy	-1165.9
12	17	Center	-1094.6
		Lowest Energy	-1094.6

13	16	Center	-1005.1
		Lowest Energy	-1197.1
14	16	Center	-1196.5
		Lowest Energy	-1196.5
15	16	Center	-1071.8
		Lowest Energy	-1274.9
16	16	Center	-1188.2
		Lowest Energy	-1188.2
17	16	Center	-1161.7
		Lowest Energy	-1244.2
18	14	Center	-1004.9
		Lowest Energy	-1190.7
19	13	Center	-1115.7
		Lowest Energy	-1144.0
20	12	Center	-1082.0
		Lowest Energy	-1167.9
21	12	Center	-1072.5
		Lowest Energy	-1072.5
22	11	Center	-1171.9
		Lowest Energy	-1256.7
23	11	Center	-1187.3
		Lowest Energy	-1187.3
24	11	Center	-1121.2
		Lowest Energy	-1121.2
25	11	Center	-1111.3
		Lowest Energy	-1210.3
26	10	Center	-1019.0
		Lowest Energy	-1117.3
27	10	Center	-1024.3
		Lowest Energy	-1093.6
28	10	Center	-1163.8

		Lowest Energy	-1163.8
29	10	Center	-1011.0
		Lowest Energy	-1089.6

TNFR2-EM			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	25	Center	-1356.8
		Lowest Energy	-1450.1
1	21	Center	-1342.7
		Lowest Energy	-1342.7
2	21	Center	-1189.2
		Lowest Energy	-1391.2
3	20	Center	-1243.8
		Lowest Energy	-1354.1
4	19	Center	-1114.9
		Lowest Energy	-1232.9
5	18	Center	-1127.8
		Lowest Energy	-1238.8
6	18	Center	-1367.1
		Lowest Energy	-1367.1
7	18	Center	-1136.3
		Lowest Energy	-1364.5
8	17	Center	-1118.9
		Lowest Energy	-1378.2
9	17	Center	-1124.0
		Lowest Energy	-1387.4
10	17	Center	-1528.1
		Lowest Energy	-1528.1
11	16	Center	-1242.4
		Lowest Energy	-1477.7

12	16	Center	-1124.0
		Lowest Energy	-1318.8
13	15	Center	-1149.1
		Lowest Energy	-1253.5
14	15	Center	-1222.2
		Lowest Energy	-1244.2
15	14	Center	-1175.4
		Lowest Energy	-1349.2
16	14	Center	-1157.6
		Lowest Energy	-1272.2
17	13	Center	-1389.6
		Lowest Energy	-1389.6
18	13	Center	-1236.1
		Lowest Energy	-1476.3
19	13	Center	-1125.1
		Lowest Energy	-1453.1
20	13	Center	-1118.8
		Lowest Energy	-1314.4
21	13	Center	-1110.2
		Lowest Energy	-1290.5
22	12	Center	-1163.1
		Lowest Energy	-1229.1
23	12	Center	-1415.0
		Lowest Energy	-1415.0
24	12	Center	-1220.5
		Lowest Energy	-1520.3
25	10	Center	-1235.8
		Lowest Energy	-1313.3
26	10	Center	-1362.7
		Lowest Energy	-1362.7
27	10	Center	-1207.1

		Lowest Energy	-1220.1
28	10	Center	-1193.4
		Lowest Energy	-1328.8
29	10	Center	-1396.0
		Lowest Energy	-1396.0

FAS-E			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	39	Center	-1158.9
		Lowest Energy	-1379.4
1	38	Center	-1227.0
		Lowest Energy	-1358.3
2	36	Center	-1153.7
		Lowest Energy	-1325.2
3	30	Center	-1302.6
		Lowest Energy	-1302.6
4	28	Center	-1150.9
		Lowest Energy	-1298.0
5	24	Center	-1268.0
		Lowest Energy	-1311.1
6	22	Center	-1244.9
		Lowest Energy	-1256.4
7	22	Center	-1217.0
		Lowest Energy	-1217.0
8	21	Center	-1202.9
		Lowest Energy	-1312.9
9	20	Center	-1232.9
		Lowest Energy	-1298.6
10	18	Center	-1140.0
		Lowest Energy	-1332.0
11	17	Center	-1103.2
		Lowest Energy	-1206.6
12	17	Center	-1166.2
		Lowest Energy	-1252.3
13	16	Center	-1256.7
		Lowest Energy	-1294.9
14	16	Center	-1152.1
		Lowest Energy	-1238.8
15	16	Center	-1215.1

		Lowest Energy	-1260.0
16	16	Center	-1262.5
		Lowest Energy	-1262.5
17	16	Center	-1128.9
		Lowest Energy	-1233.5
18	16	Center	-1279.9
		Lowest Energy	-1279.9
19	16	Center	-1196.4
		Lowest Energy	-1281.3
20	16	Center	-1177.1
		Lowest Energy	-1294.2
21	15	Center	-1215.5
		Lowest Energy	-1269.6
22	15	Center	-1127.7
		Lowest Energy	-1365.4
23	14	Center	-1255.8
		Lowest Energy	-1255.8
24	13	Center	-1158.1
		Lowest Energy	-1222.1
25	11	Center	-1114.0
		Lowest Energy	-1301.4
26	11	Center	-1225.7
		Lowest Energy	-1267.7
27	10	Center	-1252.1
		Lowest Energy	-1252.1
28	10	Center	-1171.1
		Lowest Energy	-1295.4
29	9	Center	-1135.5
		Lowest Energy	-1210.0

TNFR1-E			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	41	Center	-1104.4
		Lowest Energy	-1327.0
1	27	Center	-1101.6
		Lowest Energy	-1373.7
2	26	Center	-1250.3
		Lowest Energy	-1307.0

3	23	Center	-1099.3
		Lowest Energy	-1425.3
4	23	Center	-1104.6
		Lowest Energy	-1277.3
5	23	Center	-1135.6
		Lowest Energy	-1353.5
6	21	Center	-1179.4
		Lowest Energy	-1396.2
7	21	Center	-1508.8
		Lowest Energy	-1508.8
8	17	Center	-1231.2
		Lowest Energy	-1358.5
9	17	Center	-1170.8
		Lowest Energy	-1356.4
10	16	Center	-1095.3
		Lowest Energy	-1236.8
11	16	Center	-1277.9
		Lowest Energy	-1277.9
12	16	Center	-1087.4
		Lowest Energy	-1281.0
13	15	Center	-1143.1
		Lowest Energy	-1293.0
14	15	Center	-1141.3
		Lowest Energy	-1328.4
15	15	Center	-1257.9
		Lowest Energy	-1257.9
16	15	Center	-1404.8
		Lowest Energy	-1456.7
17	15	Center	-1136.3
		Lowest Energy	-1226.0
18	14	Center	-1154.8

		Lowest Energy	-1448.1
19	14	Center	-1138.0
		Lowest Energy	-1208.0
20	14	Center	-1167.3
		Lowest Energy	-1421.2
21	14	Center	-1140.3
		Lowest Energy	-1349.0
22	13	Center	-1214.1
		Lowest Energy	-1214.1
23	13	Center	-1137.8
		Lowest Energy	-1209.6
24	12	Center	-1117.9
		Lowest Energy	-1180.0
25	12	Center	-1256.5
		Lowest Energy	-1256.5
26	12	Center	-1255.8
		Lowest Energy	-1255.8
27	12	Center	-1225.1
		Lowest Energy	-1225.1
28	12	Center	-1209.9
		Lowest Energy	-1209.9
29	12	Center	-1191.8
		Lowest Energy	-1194.7

TNFR2-E			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	23	Center	-1162.0
		Lowest Energy	-1385.6
1	21	Center	-1139.7
		Lowest Energy	-1297.7
2	20	Center	-1132.5
		Lowest Energy	-1271.5
3	18	Center	-1195.0
		Lowest Energy	-1282.6
4	18	Center	-1147.7
		Lowest Energy	-1401.5
5	17	Center	-1147.9
		Lowest Energy	-1359.6
6	15	Center	-1224.1
		Lowest Energy	-1224.1
7	14	Center	-1170.3
		Lowest Energy	-1307.6
8	13	Center	-1323.9
		Lowest Energy	-1399.5
9	13	Center	-1245.1
		Lowest Energy	-1337.2
10	13	Center	-1217.4
		Lowest Energy	-1251.6
11	13	Center	-1176.6
		Lowest Energy	-1252.7
12	13	Center	-1165.1
		Lowest Energy	-1258.1
13	13	Center	-1157.4
		Lowest Energy	-1184.2

14	12	Center	-1120.9
		Lowest Energy	-1189.1
15	12	Center	-1275.3
		Lowest Energy	-1275.3
16	11	Center	-1188.6
		Lowest Energy	-1288.1
17	10	Center	-1498.9
		Lowest Energy	-1498.9
18	10	Center	-1222.5
		Lowest Energy	-1382.1
19	8	Center	-1117.8
		Lowest Energy	-1194.8
20	5	Center	-1137.6
		Lowest Energy	-1207.4
21	3	Center	-1127.2
		Lowest Energy	-1217.9

FAS-M			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	30	Center	-1333.9
		Lowest Energy	-1396.6
1	29	Center	-1217.9
		Lowest Energy	-1346.5
2	28	Center	-1388.6
		Lowest Energy	-1388.6
3	27	Center	-1266.2
		Lowest Energy	-1352.2
4	26	Center	-1407.8
		Lowest Energy	-1407.8
5	26	Center	-1153.1

		Lowest Energy	-1277.2
6	22	Center	-1353.0
		Lowest Energy	-1353.0
7	21	Center	-1155.4
		Lowest Energy	-1247.8
8	20	Center	-1212.3
		Lowest Energy	-1372.5
9	20	Center	-1188.6
		Lowest Energy	-1237.8
10	20	Center	-1182.7
		Lowest Energy	-1233.3
11	19	Center	-1433.0
		Lowest Energy	-1433.0
12	18	Center	-1212.9
		Lowest Energy	-1312.2
13	18	Center	-1295.4
		Lowest Energy	-1368.6
14	17	Center	-1184.1
		Lowest Energy	-1318.8
15	16	Center	-1282.1
		Lowest Energy	-1360.4
16	16	Center	-1238.6
		Lowest Energy	-1272.0
17	16	Center	-1134.4
		Lowest Energy	-1229.5
18	15	Center	-1181.7
		Lowest Energy	-1367.0
19	14	Center	-1134.2
		Lowest Energy	-1294.3
20	14	Center	-1193.9
		Lowest Energy	-1368.5

21	14	Center	-1361.2
		Lowest Energy	-1361.2
22	14	Center	-1339.1
		Lowest Energy	-1339.1
23	14	Center	-1199.5
		Lowest Energy	-1240.8
24	13	Center	-1262.4
		Lowest Energy	-1266.1
25	13	Center	-1138.9
		Lowest Energy	-1284.3
26	13	Center	-1190.5
		Lowest Energy	-1387.7
27	12	Center	-1157.4
		Lowest Energy	-1249.6
28	12	Center	-1195.2
		Lowest Energy	-1362.3
29	11	Center	-1142.6
		Lowest Energy	-1205.1

TNFR1-M			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	29	Center	-1299.3
		Lowest Energy	-1350.0
1	25	Center	-1218.8
		Lowest Energy	-1382.0
2	24	Center	-1207.9
		Lowest Energy	-1297.7
3	24	Center	-1201.8
		Lowest Energy	-1310.0
4	23	Center	-1233.0

		Lowest Energy	-1390.4
5	22	Center	-1212.5
		Lowest Energy	-1300.7
6	22	Center	-1215.1
		Lowest Energy	-1246.8
7	22	Center	-1308.3
		Lowest Energy	-1308.3
8	22	Center	-1257.6
		Lowest Energy	-1379.0
9	21	Center	-1289.8
		Lowest Energy	-1355.3
10	20	Center	-1235.2
		Lowest Energy	-1281.7
11	20	Center	-1330.5
		Lowest Energy	-1436.5
12	20	Center	-1322.6
		Lowest Energy	-1368.6
13	19	Center	-1211.4
		Lowest Energy	-1232.3
14	17	Center	-1205.5
		Lowest Energy	-1327.7
15	16	Center	-1405.3
		Lowest Energy	-1405.3
16	15	Center	-1339.3
		Lowest Energy	-1339.3
17	15	Center	-1191.9
		Lowest Energy	-1268.0
18	14	Center	-1300.6
		Lowest Energy	-1300.6
19	13	Center	-1233.0
		Lowest Energy	-1422.1

20	13	Center	-1448.5
		Lowest Energy	-1448.5
21	13	Center	-1177.4
		Lowest Energy	-1255.5
22	12	Center	-1189.0
		Lowest Energy	-1351.9
23	12	Center	-1362.8
		Lowest Energy	-1362.8
24	12	Center	-1247.8
		Lowest Energy	-1247.8
25	12	Center	-1185.4
		Lowest Energy	-1207.5
26	11	Center	-1166.7
		Lowest Energy	-1224.6
27	11	Center	-1142.4
		Lowest Energy	-1221.1
28	11	Center	-1141.7
		Lowest Energy	-1179.3
29	11	Center	-1130.1
		Lowest Energy	-1231.2

TNFR2-M			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	37	Center	-1273.2
		Lowest Energy	-1383.3
1	31	Center	-1212.6
		Lowest Energy	-1430.7
2	28	Center	-1234.6
		Lowest Energy	-1319.8
3	28	Center	-1304.7
		Lowest Energy	-1343.1

4	26	Center	-1308.7
		Lowest Energy	-1318.3
5	26	Center	-1325.5
		Lowest Energy	-1329.5
6	26	Center	-1255.1
		Lowest Energy	-1297.5
7	26	Center	-1338.4
		Lowest Energy	-1338.4
8	25	Center	-1346.4
		Lowest Energy	-1352.8
9	25	Center	-1257.8
		Lowest Energy	-1257.8
10	22	Center	-1331.1
		Lowest Energy	-1331.1
11	21	Center	-1151.6
		Lowest Energy	-1330.6
12	21	Center	-1221.0
		Lowest Energy	-1307.7
13	21	Center	-1161.0
		Lowest Energy	-1486.5
14	18	Center	-1212.7
		Lowest Energy	-1233.3
15	18	Center	-1152.3
		Lowest Energy	-1393.9
16	18	Center	-1290.5
		Lowest Energy	-1290.5
17	18	Center	-1271.8
		Lowest Energy	-1310.9
18	15	Center	-1298.5
		Lowest Energy	-1298.5
19	15	Center	-1174.4

		Lowest Energy	-1376.4
20	14	Center	-1203.6
		Lowest Energy	-1259.2
21	14	Center	-1175.1
		Lowest Energy	-1204.6
22	13	Center	-1159.5
		Lowest Energy	-1310.0
23	13	Center	-1368.4
		Lowest Energy	-1368.4
24	13	Center	-1175.5
		Lowest Energy	-1211.4
25	12	Center	-1167.6
		Lowest Energy	-1332.5
26	12	Center	-1319.1
		Lowest Energy	-1348.3
27	12	Center	-1194.8
		Lowest Energy	-1258.3
28	11	Center	-1186.5
		Lowest Energy	-1238.1
29	11	Center	-1224.0
		Lowest Energy	-1224.0

FAS-prM			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	26	Center	-1057.9
		Lowest Energy	-1057.9
1	25	Center	-1123.1
		Lowest Energy	-1183.4
2	23	Center	-1080.1
		Lowest Energy	-1148.9

3	22	Center	-1116.6
		Lowest Energy	-1116.6
4	19	Center	-1081.7
		Lowest Energy	-1081.7
5	19	Center	-1032.3
		Lowest Energy	-1032.3
6	18	Center	-1111.3
		Lowest Energy	-1111.3
7	17	Center	-1040.9
		Lowest Energy	-1040.9
8	17	Center	-1009.5
		Lowest Energy	-1021.9
9	14	Center	-1123.8
		Lowest Energy	-1123.8
10	13	Center	-1159.3
		Lowest Energy	-1159.3
11	13	Center	-1125.8
		Lowest Energy	-1125.8
12	13	Center	-1094.6
		Lowest Energy	-1094.6
13	12	Center	-1171.9
		Lowest Energy	-1171.9
14	12	Center	-1155.5
		Lowest Energy	-1155.5
15	11	Center	-1133.8
		Lowest Energy	-1133.8
16	10	Center	-1222.7
		Lowest Energy	-1222.7
17	10	Center	-1126.7
		Lowest Energy	-1126.7

18	10	Center	-1123.8
		Lowest Energy	-1179.1
19	10	Center	-1076.5
		Lowest Energy	-1076.5
20	10	Center	-1051.8
		Lowest Energy	-1137.6
21	10	Center	-1001
		Lowest Energy	-1091.5
22	10	Center	-991.2
		Lowest Energy	-1070.2
23	10	Center	-984.8
		Lowest Energy	-1052.2
24	9	Center	-982.7
		Lowest Energy	-1153.9
25	7	Center	-1138
		Lowest Energy	-1138
26	4	Center	-1027.6
		Lowest Energy	-1081.9
27	4	Center	-985.3
		Lowest Energy	-1049.8
28	3	Center	-992.6
		Lowest Energy	-1047.8

TNFR1-prM			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	44	Center	-1162.1
		Lowest Energy	-1246.2
1	37	Center	-1068.8
		Lowest Energy	-1258.9
2	36	Center	-1093.5

		Lowest Energy	-1198.9
3	34	Center	-1159
		Lowest Energy	-1216.9
4	29	Center	-1139.7
		Lowest Energy	-1139.7
5	26	Center	-1095.5
		Lowest Energy	-1181.7
6	24	Center	-1112.6
		Lowest Energy	-1255.4
7	20	Center	-1157.6
		Lowest Energy	-1200
8	19	Center	-1143.8
		Lowest Energy	-1258.8
9	19	Center	-1060.2
		Lowest Energy	-1162.6
10	17	Center	-1021.7
		Lowest Energy	-1296.2
11	17	Center	-1141.9
		Lowest Energy	-1321.2
12	16	Center	-1147.6
		Lowest Energy	-1164
13	15	Center	-1070.6
		Lowest Energy	-1192.1
14	15	Center	-1056.6
		Lowest Energy	-1072.3
15	14	Center	-1207.3
		Lowest Energy	-1207.3
16	14	Center	-1088.2
		Lowest Energy	-1227.1
17	14	Center	-1075
		Lowest Energy	-1154.7

18	13	Center	-1186.9
		Lowest Energy	-1186.9
19	13	Center	-1109.9
		Lowest Energy	-1134.1
20	12	Center	-1194
		Lowest Energy	-1201.4
21	12	Center	-1148.8
		Lowest Energy	-1183.9
22	12	Center	-1067.3
		Lowest Energy	-1107.5
23	12	Center	-1042.6
		Lowest Energy	-1127.7
24	12	Center	-1026.1
		Lowest Energy	-1075.3
25	11	Center	-1073.5
		Lowest Energy	-1130.1
26	11	Center	-1049.2
		Lowest Energy	-1096.2
27	11	Center	-1039.3
		Lowest Energy	-1111.2
28	10	Center	-1124.6
		Lowest Energy	-1186.3
29	10	Center	-1098.9
		Lowest Energy	-1098.9

TNFR2-prM			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	41	Center	-1321.1
		Lowest Energy	-1361.2
1	25	Center	-1056

		Lowest Energy	-1141.9
2	24	Center	-1077.8
		Lowest Energy	-1077.8
3	23	Center	-1144.3
		Lowest Energy	-1144.3
4	21	Center	-1028.9
		Lowest Energy	-1078.9
5	19	Center	-1128.6
		Lowest Energy	-1152.3
6	18	Center	-1185.2
		Lowest Energy	-1185.2
7	18	Center	-1059.4
		Lowest Energy	-1059.4
8	17	Center	-1042.5
		Lowest Energy	-1092.6
9	17	Center	-1183.8
		Lowest Energy	-1183.8
10	17	Center	-1090.6
		Lowest Energy	-1090.6
11	16	Center	-1053
		Lowest Energy	-1053
12	15	Center	-1006.2
		Lowest Energy	-1133.6
13	14	Center	-1129.2
		Lowest Energy	-1129.2
14	13	Center	-1090.7
		Lowest Energy	-1090.7
15	12	Center	-989.6
		Lowest Energy	-1051.2
16	11	Center	-1048.8
		Lowest Energy	-1113.8

17	11	Center	-1011.2
		Lowest Energy	-1040
18	10	Center	-1187.7
		Lowest Energy	-1187.7
19	10	Center	-1123
		Lowest Energy	-1123
20	7	Center	-1043.4
		Lowest Energy	-1043.4
21	4	Center	-972.9
		Lowest Energy	-972.9
22	3	Center	-1005
		Lowest Energy	-1033

FAS-pr			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	53	Center	-831.5
		Lowest Energy	-952.6
1	52	Center	-897.2
		Lowest Energy	-964.4
2	47	Center	-909.1
		Lowest Energy	-981.8
3	34	Center	-834.2
		Lowest Energy	-1030.8
4	33	Center	-884.0
		Lowest Energy	-1007.1
5	29	Center	-930.4
		Lowest Energy	-930.4
6	27	Center	-861.0
		Lowest Energy	-1067.3
7	27	Center	-935.8

		Lowest Energy	-1073.3
8	27	Center	-882.2
		Lowest Energy	-953.7
9	26	Center	-1058.0
		Lowest Energy	-1058.0
10	25	Center	-907.6
		Lowest Energy	-910.6
11	24	Center	-893.1
		Lowest Energy	-914.0
12	24	Center	-956.9
		Lowest Energy	-956.9
13	23	Center	-946.9
		Lowest Energy	-990.6
14	21	Center	-994.4
		Lowest Energy	-994.4
15	20	Center	-937.2
		Lowest Energy	-937.2
16	19	Center	-1036.7
		Lowest Energy	-1036.7
17	18	Center	-887.8
		Lowest Energy	-920.1
18	18	Center	-851.7
		Lowest Energy	-968.5
19	18	Center	-985.8
		Lowest Energy	-985.8
20	18	Center	-931.3
		Lowest Energy	-931.3
21	18	Center	-913.6
		Lowest Energy	-913.6
22	17	Center	-901.2
		Lowest Energy	-963.2

23	16	Center	-891.4
		Lowest Energy	-950.5
24	16	Center	-922.2
		Lowest Energy	-922.2
25	16	Center	-916.0
		Lowest Energy	-916.0
26	15	Center	-855.8
		Lowest Energy	-943.0
27	14	Center	-863.0
		Lowest Energy	-968.5
28	14	Center	-880.9
		Lowest Energy	-880.9
29	13	Center	-864.3
		Lowest Energy	-980.9

TNFR1-pr			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	125	Center	-973.7
		Lowest Energy	-1204.5
1	103	Center	-1025.8
		Lowest Energy	-1259.4
2	97	Center	-950.9
		Lowest Energy	-1124.4
3	46	Center	-985.1
		Lowest Energy	-1249.6
4	43	Center	-944.5
		Lowest Energy	-1087.8
5	41	Center	-983.2
		Lowest Energy	-1173.9
6	41	Center	-978.7

		Lowest Energy	-1197.0
7	40	Center	-1083.3
		Lowest Energy	-1202.7
8	39	Center	-946.3
		Lowest Energy	-1168.9
9	33	Center	-1055.8
		Lowest Energy	-1122.1
10	29	Center	-962.3
		Lowest Energy	-1223.1
11	26	Center	-975.8
		Lowest Energy	-1079.6
12	21	Center	-996.1
		Lowest Energy	-1137.2
13	17	Center	-1121.2
		Lowest Energy	-1121.2
14	17	Center	-1025.9
		Lowest Energy	-1025.9
15	13	Center	-980.3
		Lowest Energy	-980.3
16	12	Center	-972.1
		Lowest Energy	-1015.4
17	12	Center	-1011.2
		Lowest Energy	-1067.8
18	12	Center	-991.0
		Lowest Energy	-1062.3
19	12	Center	-989.0
		Lowest Energy	-1050.8
20	11	Center	-960.6
		Lowest Energy	-1012.8
21	10	Center	-958.8
		Lowest Energy	-1054.2

22	10	Center	-1044.6
		Lowest Energy	-1044.6
23	10	Center	-1006.1
		Lowest Energy	-1006.1
24	6	Center	-983.2
		Lowest Energy	-983.2
25	6	Center	-942.3
		Lowest Energy	-957.3
26	4	Center	-967.2
		Lowest Energy	-992.3
27	4	Center	-1036.0
		Lowest Energy	-1185.1
28	3	Center	-959.9
		Lowest Energy	-967.2
29	2	Center	-950.8
		Lowest Energy	-950.8

TNFR2-pr			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	113	Center	-984.9
		Lowest Energy	-1083.1
1	94	Center	-1001.1
		Lowest Energy	-1004.1
2	82	Center	-945.3
		Lowest Energy	-1012.5
3	66	Center	-1006.4
		Lowest Energy	-1070.6
4	50	Center	-875.6
		Lowest Energy	-961.1
5	45	Center	-850.9

		Lowest Energy	-1020.0
6	42	Center	-866.3
		Lowest Energy	-990.1
7	34	Center	-878.7
		Lowest Energy	-1074.8
8	31	Center	-934.3
		Lowest Energy	-966.9
9	26	Center	-862.5
		Lowest Energy	-936.2
10	25	Center	-896.9
		Lowest Energy	-915.7
11	24	Center	-895.5
		Lowest Energy	-922.0
12	20	Center	-855.9
		Lowest Energy	-911.6
13	18	Center	-973.1
		Lowest Energy	-973.1
14	18	Center	-869.3
		Lowest Energy	-938.6
15	17	Center	-869.5
		Lowest Energy	-913.1
16	16	Center	-870.2
		Lowest Energy	-958.2
17	13	Center	-936.8
		Lowest Energy	-936.8
18	12	Center	-844.7
		Lowest Energy	-903.4
19	12	Center	-887.3
		Lowest Energy	-887.3
20	11	Center	-876.4
		Lowest Energy	-907.3

21	10	Center	-871.4
		Lowest Energy	-905.5
22	10	Center	-905.0
		Lowest Energy	-905.0

FAS-NS1			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	34	Center	-1231.5
		Lowest Energy	-1310.5
1	32	Center	-927.3
		Lowest Energy	-1010.1
2	30	Center	-963.4
		Lowest Energy	-1022.9
3	29	Center	-941
		Lowest Energy	-1076.8
4	26	Center	-1038.9
		Lowest Energy	-1167.9
5	25	Center	-1113.5
		Lowest Energy	-1145.7
6	23	Center	-1191.8
		Lowest Energy	-1291.5
7	22	Center	-1069.3
		Lowest Energy	-1170.4
8	22	Center	-1068.4
		Lowest Energy	-1299.1
9	21	Center	-942.2
		Lowest Energy	-1000.1
10	20	Center	-966.6
		Lowest Energy	-1064.4
11	20	Center	-1081.4

		Lowest Energy	-1099.5
12	20	Center	-1101.3
		Lowest Energy	-1332
13	19	Center	-1029.6
		Lowest Energy	-1029.6
14	19	Center	-1012
		Lowest Energy	-1026.9
15	19	Center	-919.3
		Lowest Energy	-1014
16	18	Center	-983.1
		Lowest Energy	-1029.4
17	18	Center	-1000.2
		Lowest Energy	-1038.1
18	18	Center	-1064.9
		Lowest Energy	-1064.9
19	17	Center	-952.5
		Lowest Energy	-1044.5
20	16	Center	-933.2
		Lowest Energy	-1101.1
21	15	Center	-912.7
		Lowest Energy	-1176.1
22	14	Center	-980.1
		Lowest Energy	-1192
23	12	Center	-1144.4
		Lowest Energy	-1144.4
24	12	Center	-1016.9
		Lowest Energy	-1016.9
25	11	Center	-926.2
		Lowest Energy	-1010.8
26	11	Center	-915.9
		Lowest Energy	-1044.6

27	10	Center	-1168.3
		Lowest Energy	-1168.3
28	10	Center	-958.4
		Lowest Energy	-1016.4
29	10	Center	-923.7
		Lowest Energy	-1064.1

TNFR1-NS1			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	52	Center	-877.6
		Lowest Energy	-1051.5
1	43	Center	-933.2
		Lowest Energy	-1057.1
2	40	Center	-946.1
		Lowest Energy	-1062.8
3	27	Center	-931.5
		Lowest Energy	-994.8
4	26	Center	-1007.7
		Lowest Energy	-1030.5
5	25	Center	-1060
		Lowest Energy	-1060
6	24	Center	-897.8
		Lowest Energy	-1098.2
7	23	Center	-1044.2
		Lowest Energy	-1044.2
8	21	Center	-876.2
		Lowest Energy	-1013.7
9	20	Center	-956.1
		Lowest Energy	-956.1
10	19	Center	-1058

		Lowest Energy	-1058
11	19	Center	-1000.6
		Lowest Energy	-1000.6
12	19	Center	-919.6
		Lowest Energy	-919.6
13	19	Center	-906.3
		Lowest Energy	-906.3
14	18	Center	-958.1
		Lowest Energy	-958.1
15	16	Center	-865.6
		Lowest Energy	-1039.1
16	15	Center	-1108.7
		Lowest Energy	-1108.7
17	15	Center	-999.1
		Lowest Energy	-999.1
18	15	Center	-988.2
		Lowest Energy	-988.2
19	15	Center	-863.1
		Lowest Energy	-957.3
20	14	Center	-1030.4
		Lowest Energy	-1030.4
21	13	Center	-992.3
		Lowest Energy	-992.3
22	13	Center	-872.1
		Lowest Energy	-1078.1
23	12	Center	-1027.5
		Lowest Energy	-1027.5
24	11	Center	-904.6
		Lowest Energy	-1047.8
25	11	Center	-986.7
		Lowest Energy	-986.7

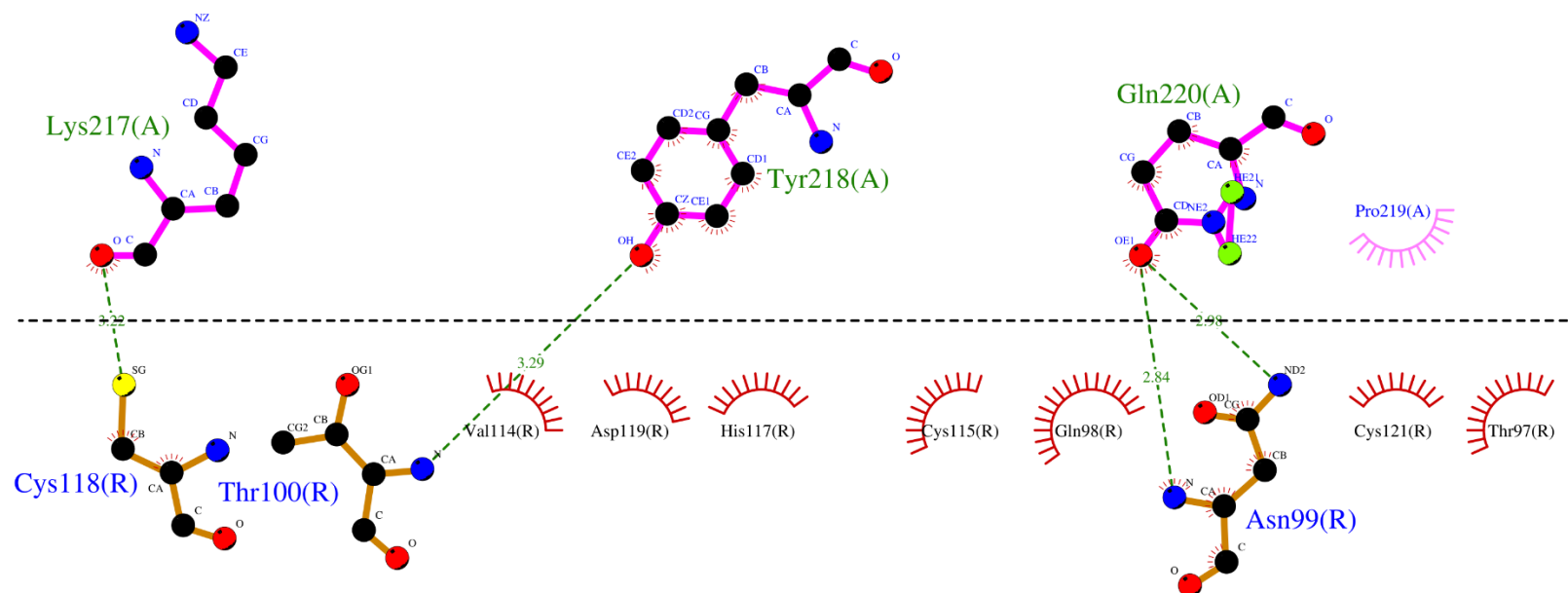
26	11	Center	-960.9
		Lowest Energy	-982.4
27	10	Center	-1067.7
		Lowest Energy	-1067.7
28	10	Center	-1031.8
		Lowest Energy	-1031.8
29	10	Center	-1016.1
		Lowest Energy	-1075.5

TNFR2-NS1			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	25	Center	-1136.5
		Lowest Energy	-1224.7
1	22	Center	-943.3
		Lowest Energy	-1195
2	20	Center	-1111.5
		Lowest Energy	-1111.5
3	19	Center	-1019.7
		Lowest Energy	-1128.8
4	19	Center	-1035.8
		Lowest Energy	-1309.3
5	18	Center	-1085.1
		Lowest Energy	-1086.7
6	18	Center	-948.9
		Lowest Energy	-1026.5
7	15	Center	-1165.8
		Lowest Energy	-1165.8
8	14	Center	-968.2
		Lowest Energy	-1198.7
9	14	Center	-1096.7

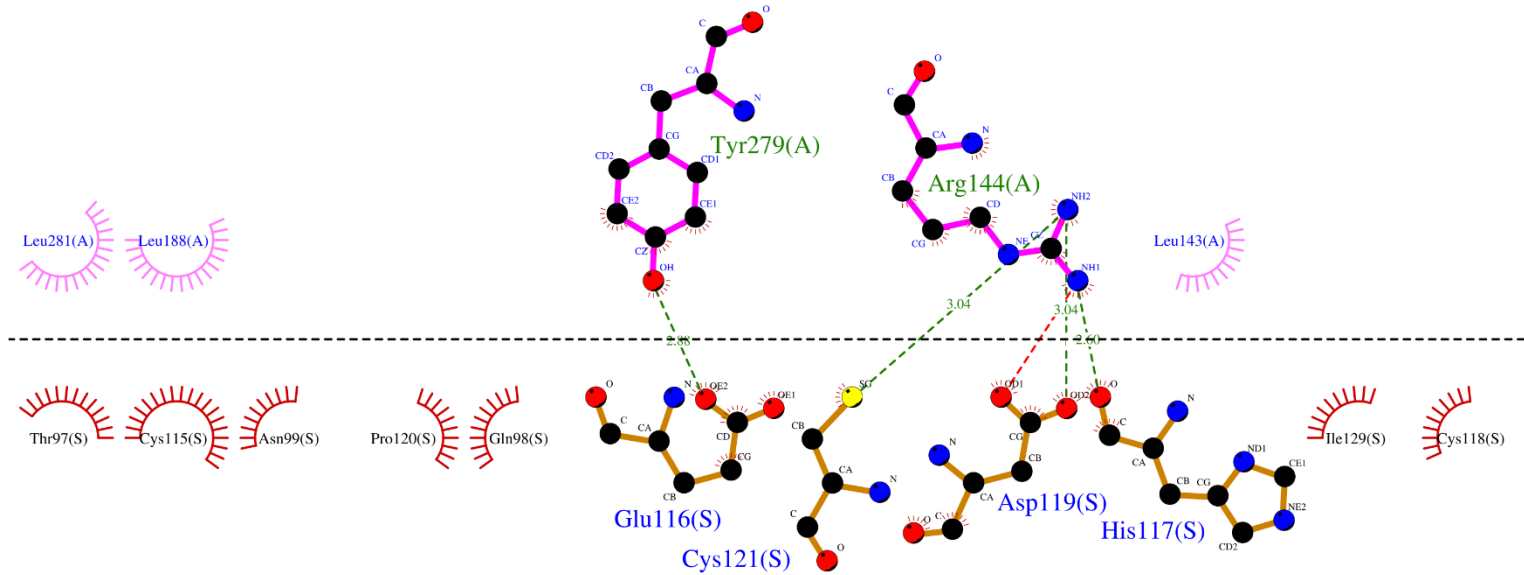
		Lowest Energy	-1096.7
10	13	Center	-1124.4
		Lowest Energy	-1124.4
11	13	Center	-977.9
		Lowest Energy	-1177.7
12	13	Center	-946.8
		Lowest Energy	-1098.8
13	12	Center	-1041.9
		Lowest Energy	-1105.9
14	12	Center	-1165.7
		Lowest Energy	-1165.7
15	12	Center	-952
		Lowest Energy	-1148.7
16	11	Center	-1186.6
		Lowest Energy	-1186.6
17	10	Center	-1008.4
		Lowest Energy	-1201.9
18	10	Center	-1004.5
		Lowest Energy	-1118.7
19	10	Center	-1017.7
		Lowest Energy	-1176.2
20	10	Center	-973
		Lowest Energy	-1031.9
21	10	Center	-965.5
		Lowest Energy	-1028
22	10	Center	-941.2
		Lowest Energy	-1062.5
23	9	Center	-1277.3
		Lowest Energy	-1277.3
24	9	Center	-972.7
		Lowest Energy	-994.8

25	7	Center	-993.7
		Lowest Energy	-1108.3
26	6	Center	-1103
		Lowest Energy	-1112.4
27	3	Center	-1013.4
		Lowest Energy	-1028.8

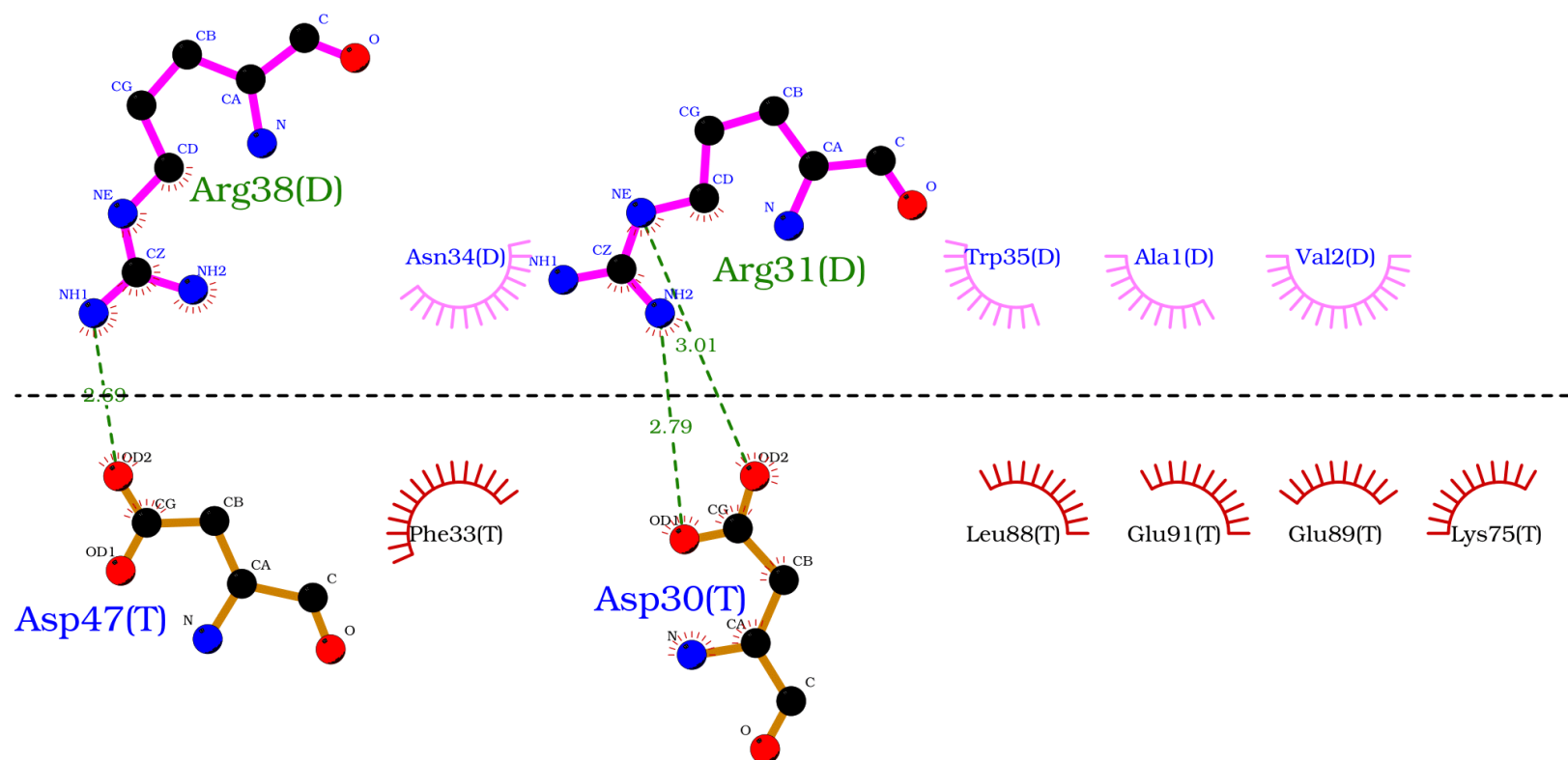
ANEXO B – INTERAÇÕES MOLECULAR



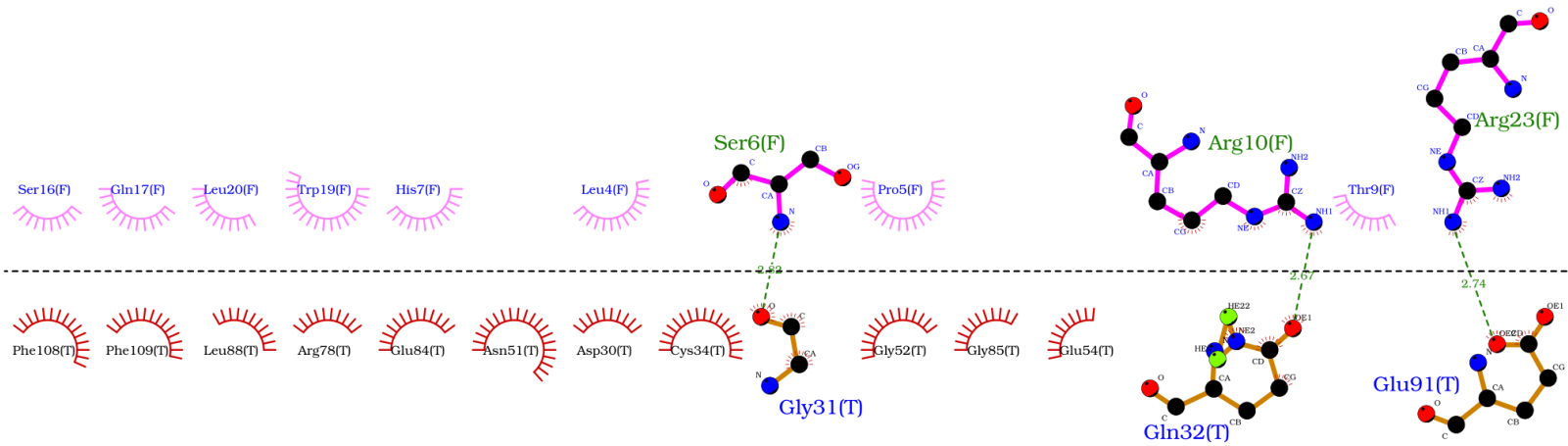
FAS-FASL_CLUSTER-14_990



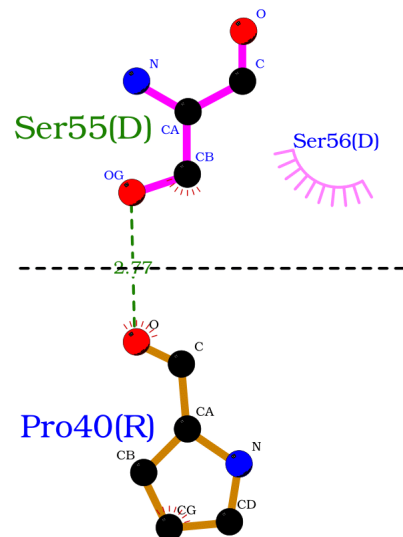
FAS-FASL_CLUSTER-14_990



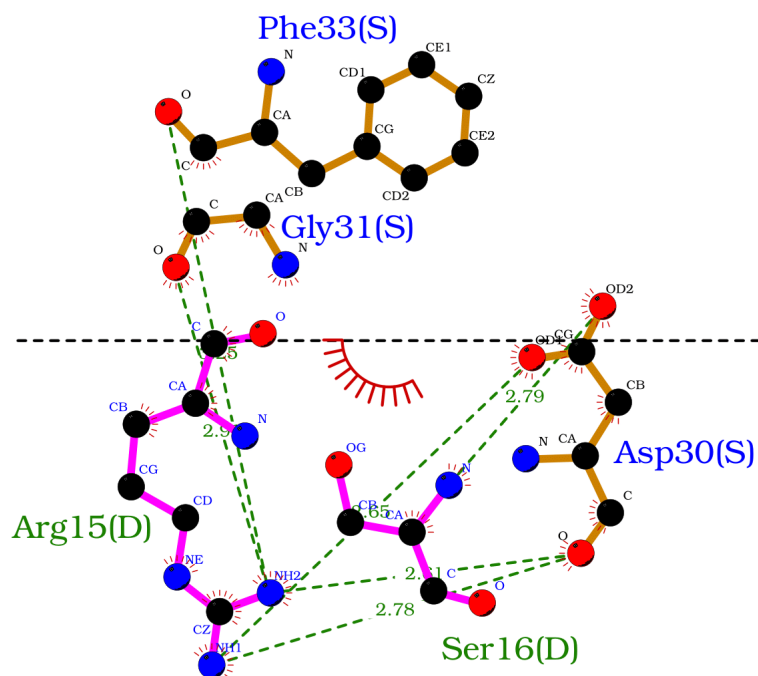
FAS-M_CLUSTER-11_1433



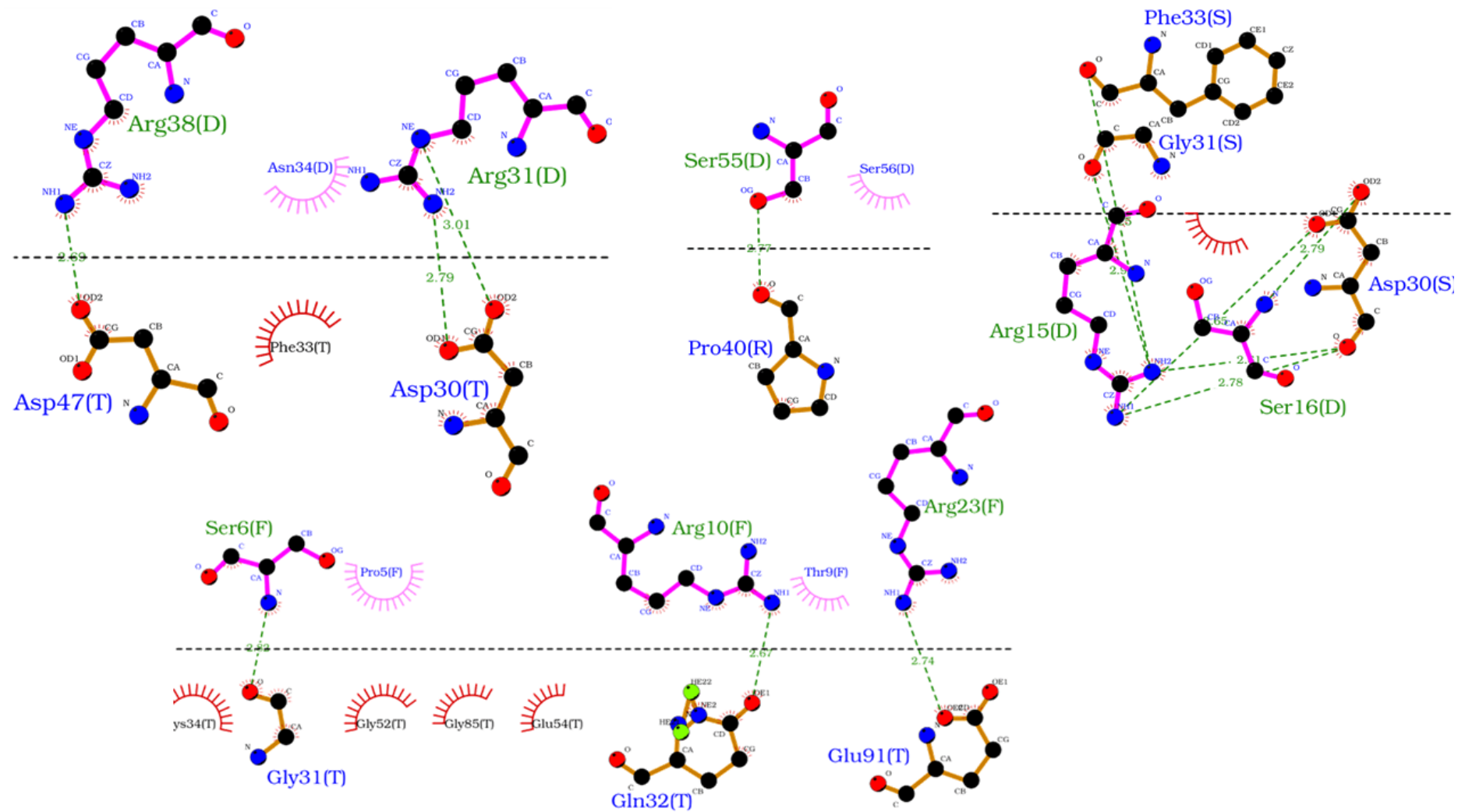
FAS-M_CLUSTER-11_1433

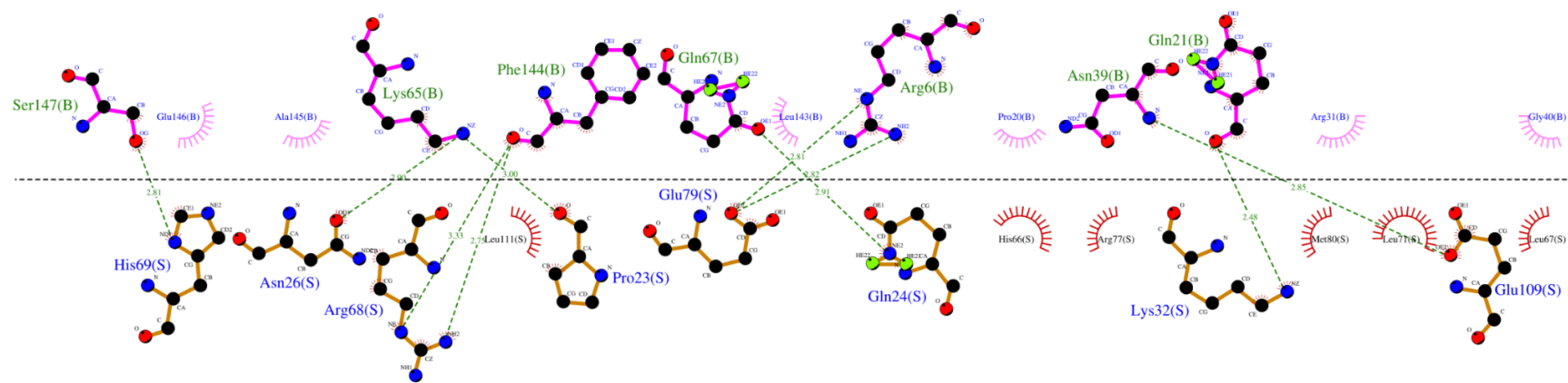


FAS-M_CLUSTER-11_1433

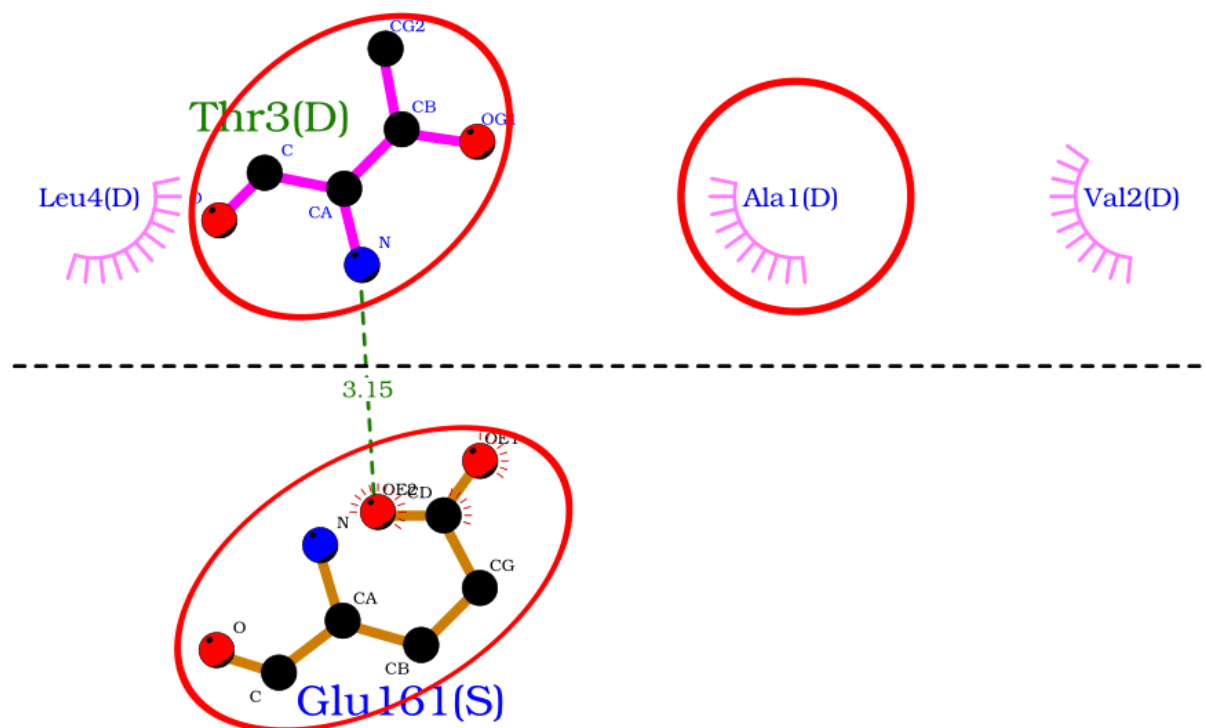


FAS-M_CLUSTER-11_1433_2

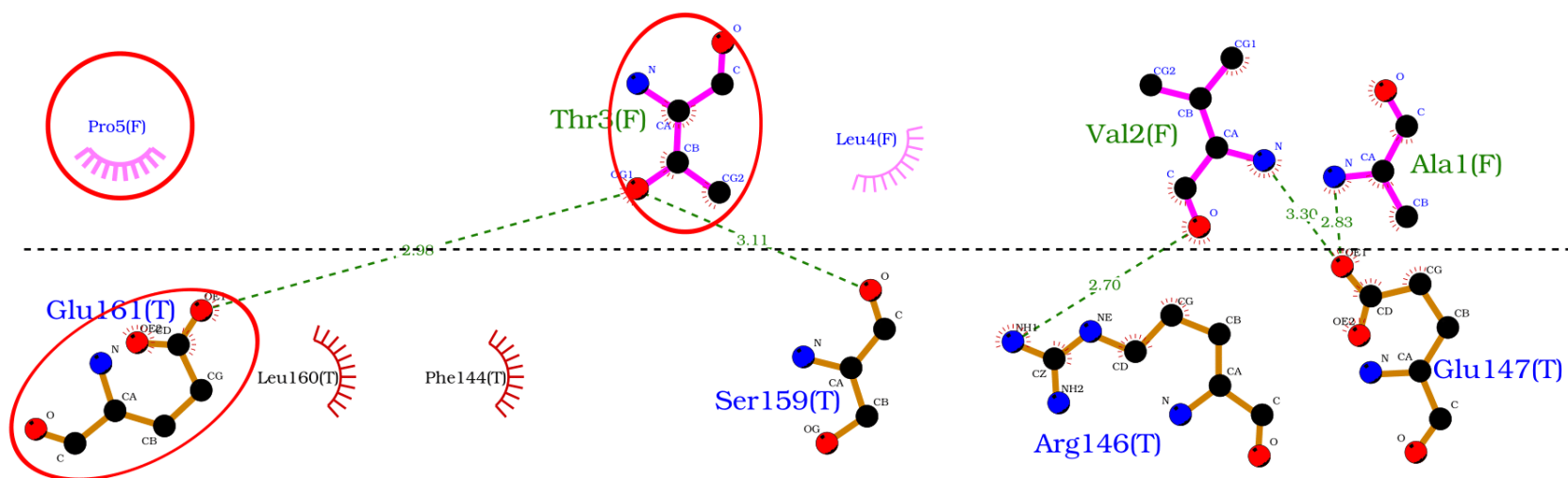




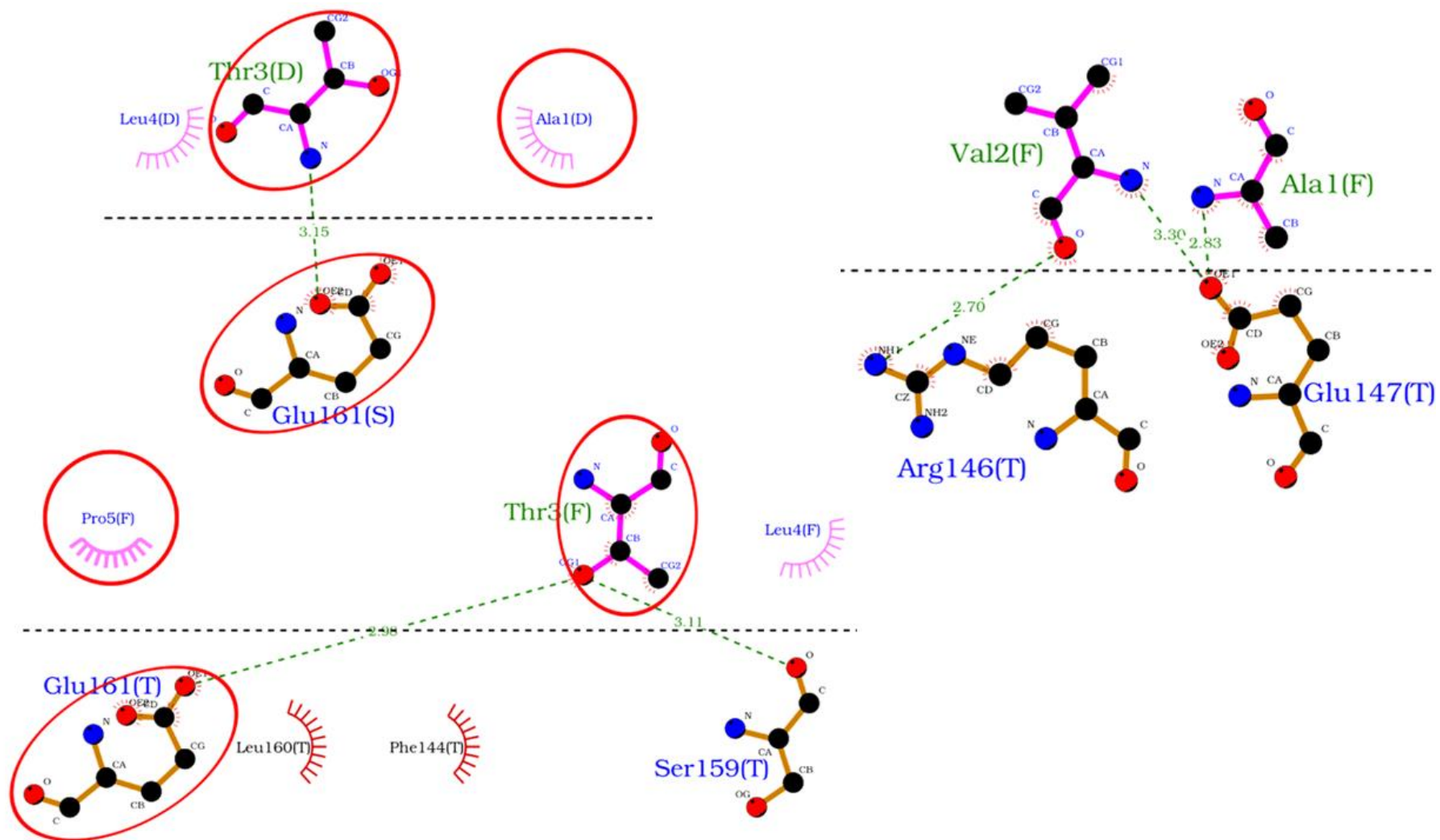
TNFR1-TNFALFA_CLUSTER-0_-1300



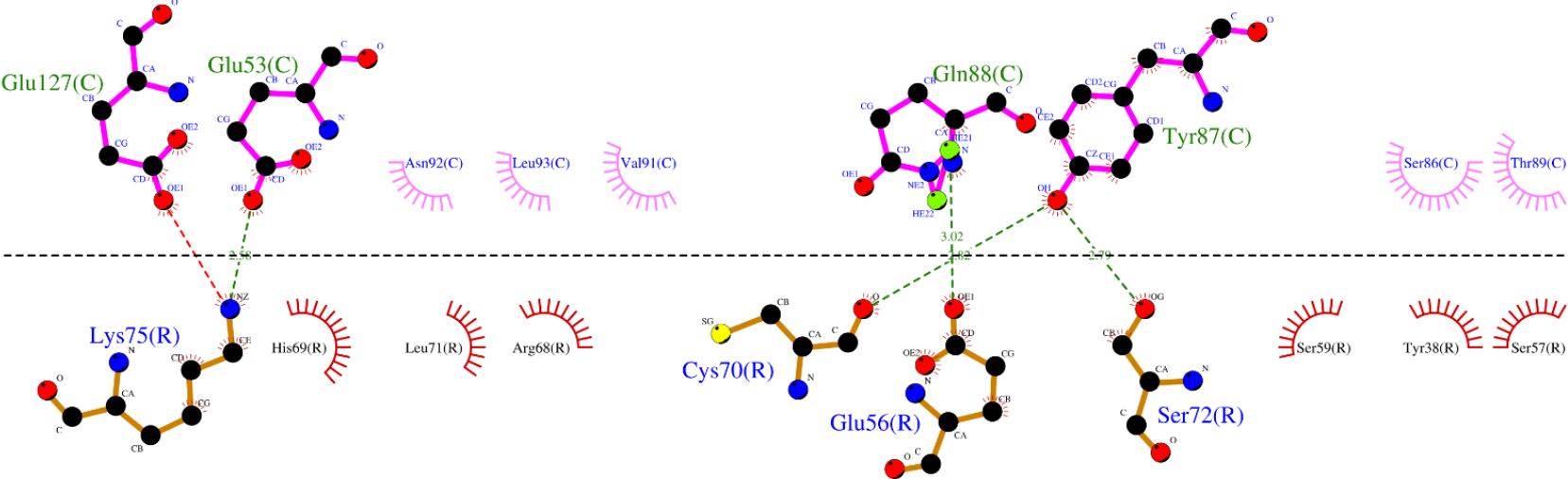
TNFR1-M-CLUSTER-1_1382



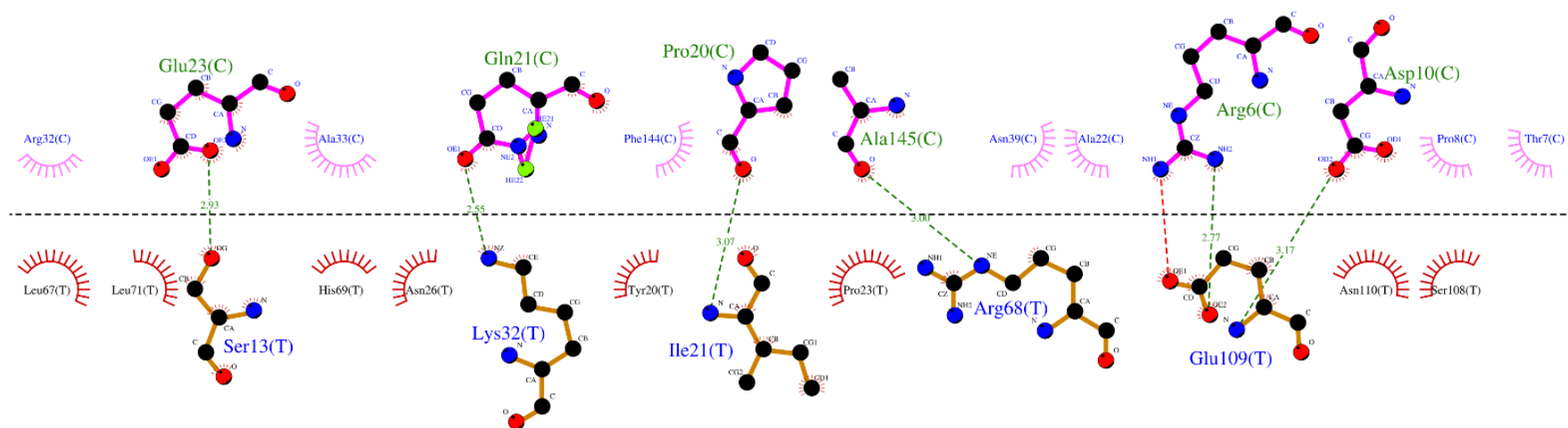
TNFR1-M-CLUSTER-1_1382_2



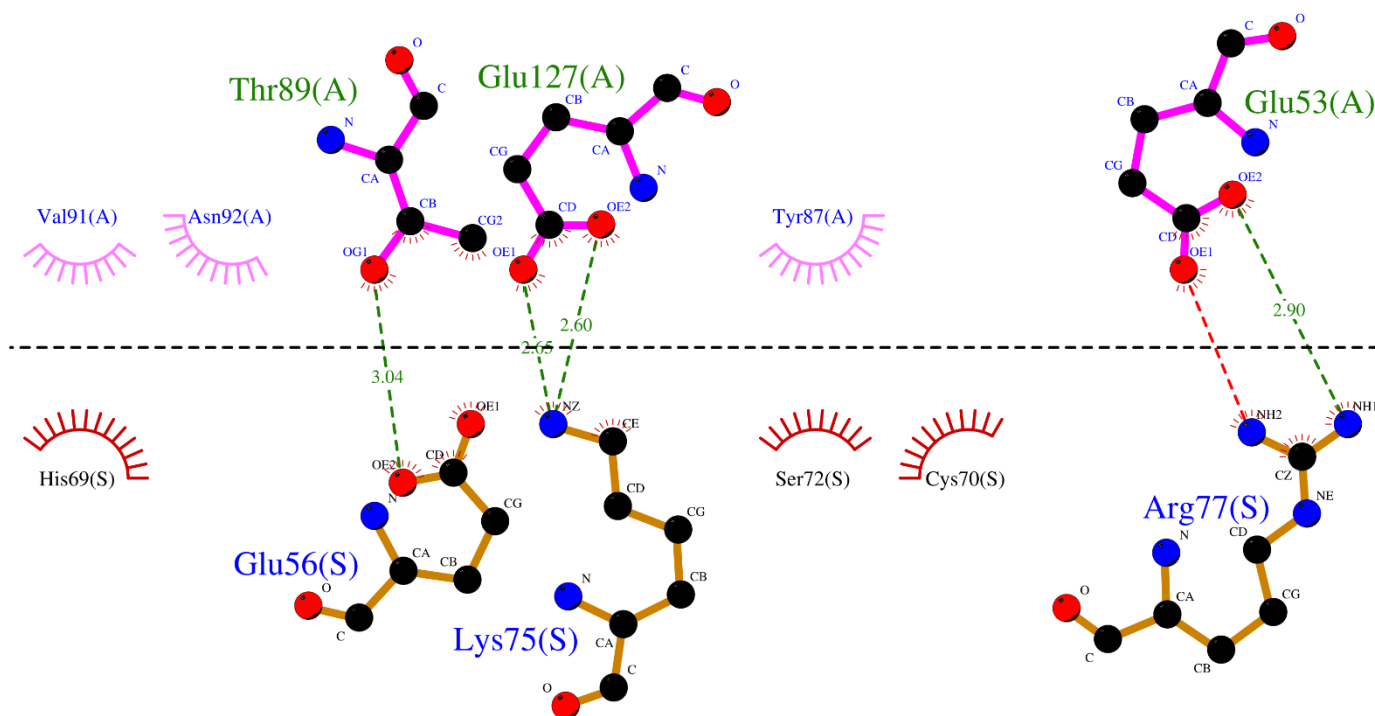




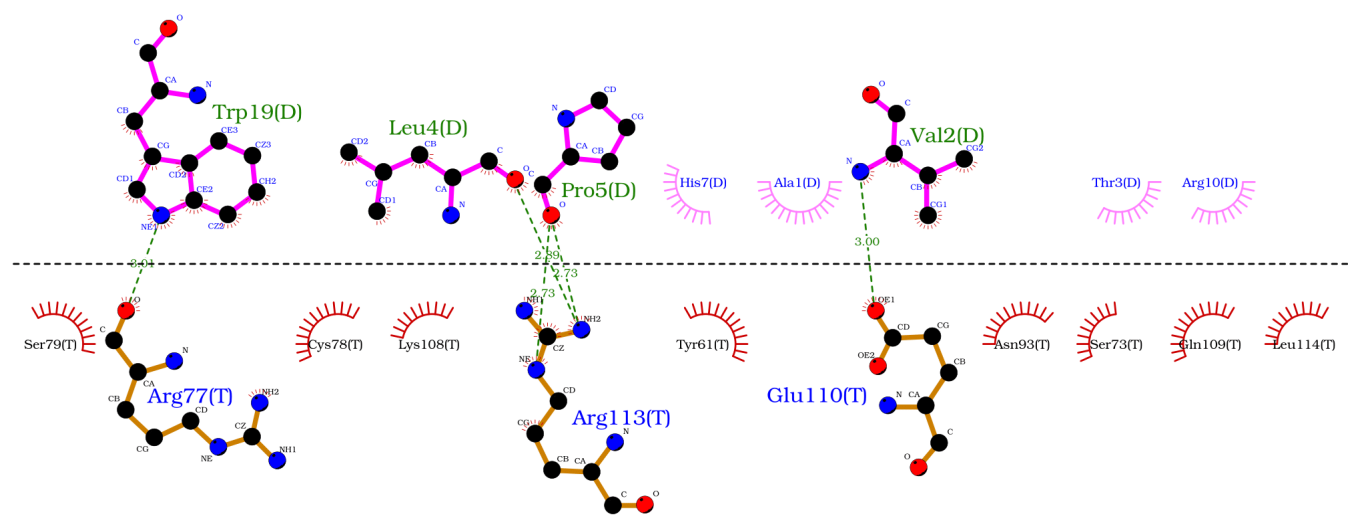
TNFR1-TNFALFA_CLUSTER-0_-1300



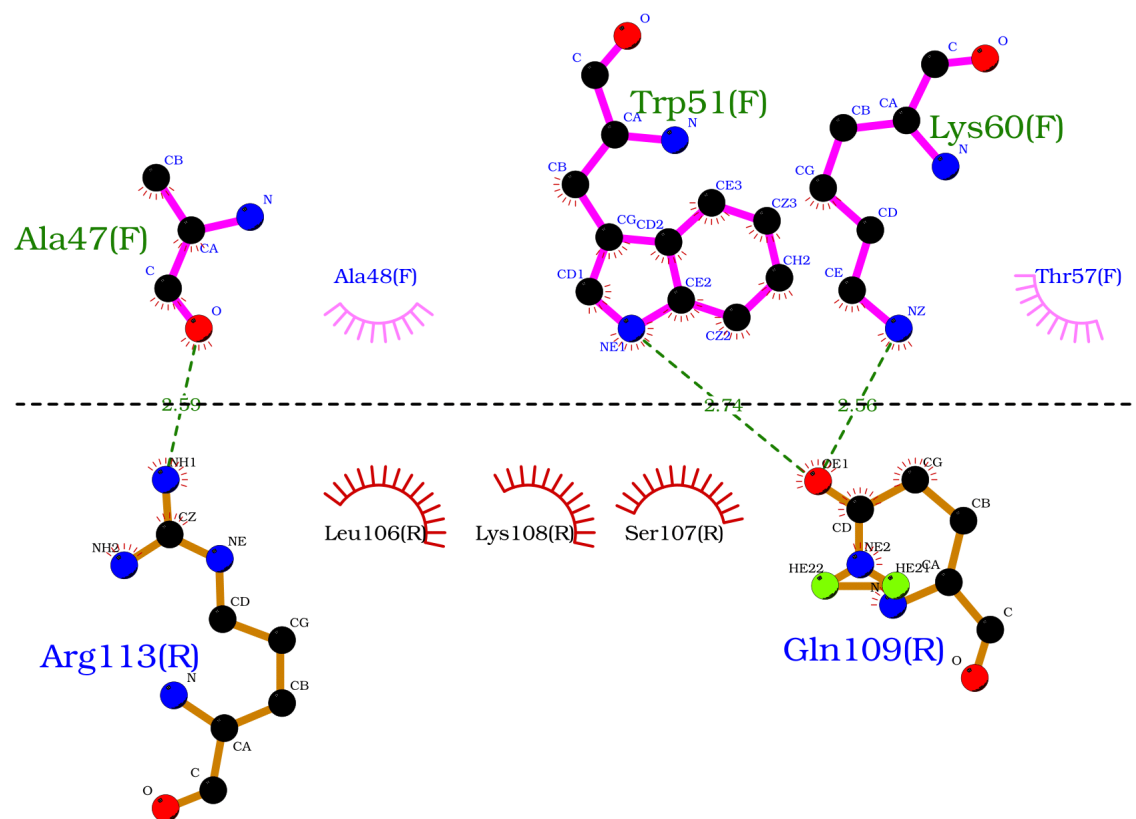
TNFR1-TNFA_CLUSTER-0_-1300



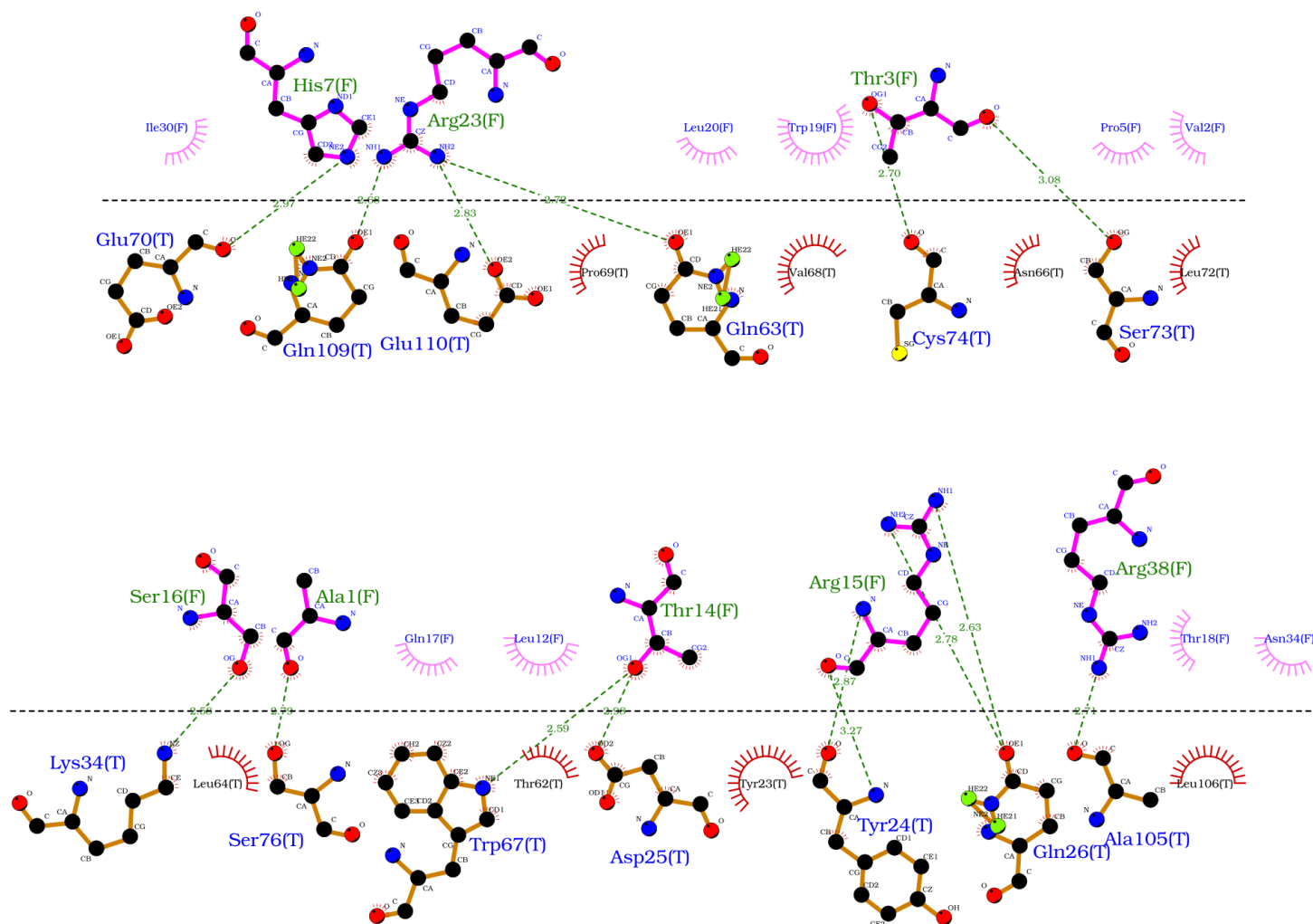
TNFR1-TNFALFA_CLUSTER-0_-1300



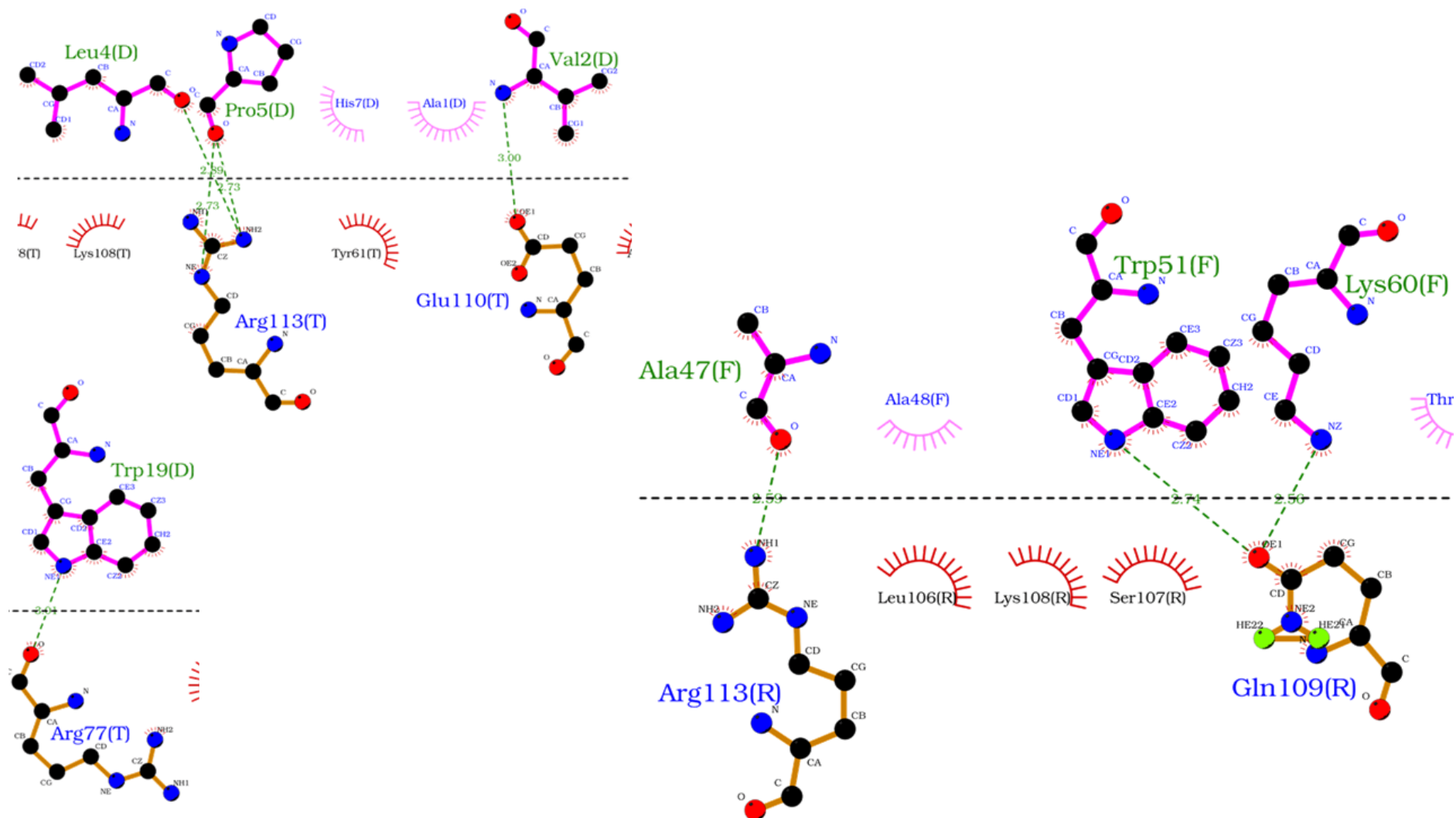
TNFR2-M_CLUSTER-0_1383

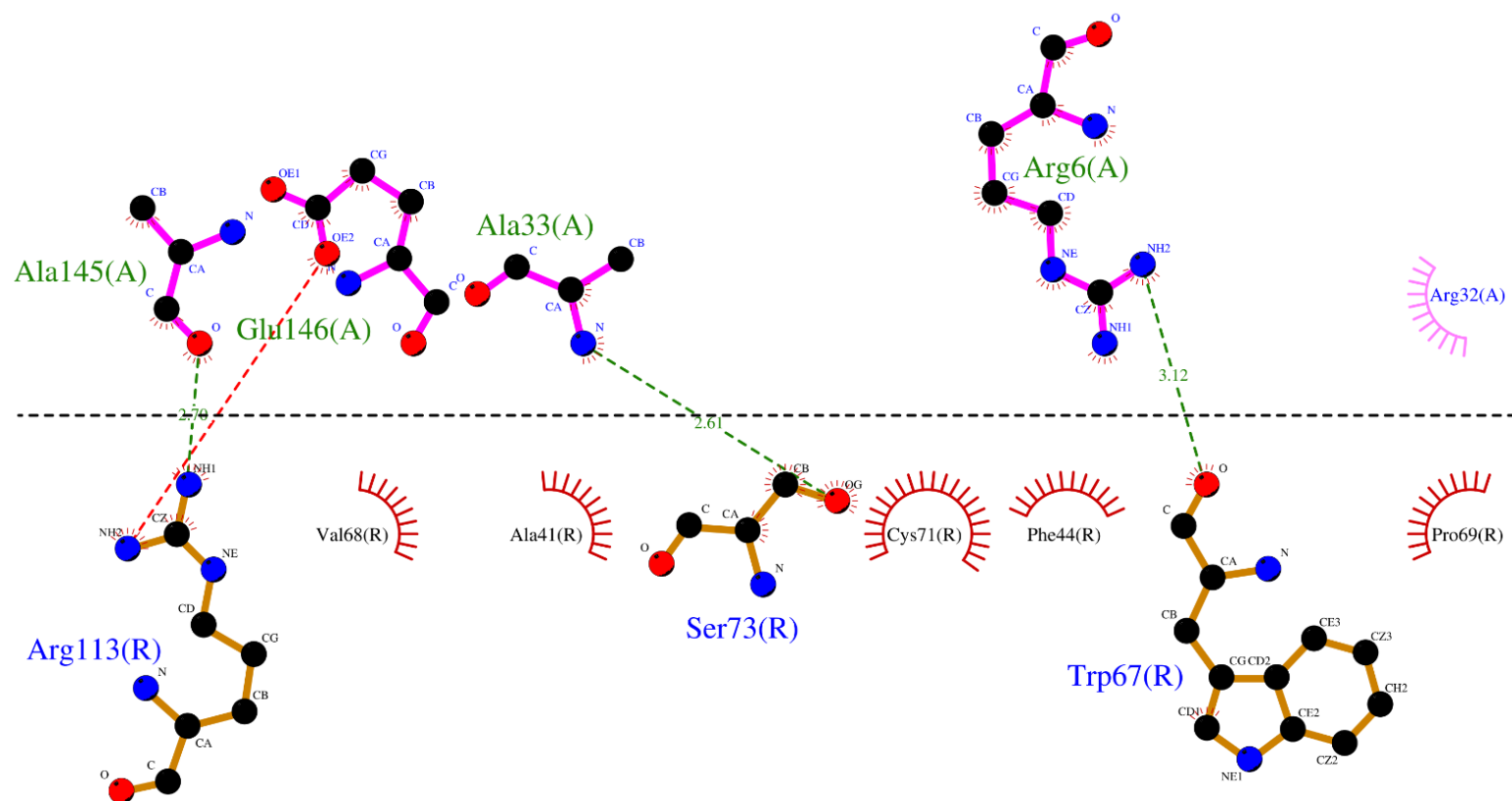


TNFR2-M_CLUSTER-0_1383



TNFR2-M_CLUSTER-0_1383





TNFR2-TNFALFA_CLUSTER-5_1839

ANEXO C – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

APOPTOSE

	y	x1	x2	x3	
1	0.05899436	nonvir	00h	CHL	
2	0.12811998	nonvir	00h	CHL	
5	0.01566580	vir	00h	CHL	
6	0.01646091	vir	00h	CHL	
3	0.17115252	nonvir	24h	CHL	
4	0.45773196	nonvir	24h	CHL	
9	0.06736842	vir	24h	CHL	
10	0.07738095	vir	24h	CHL	
7	0.20589456	nonvir	48h	CHL	
8	0.15183610	nonvir	48h	CHL	
11	0.02251879	vir	48h	CHL	
12	0.02804582	vir	48h	CHL	
13	0.06888631	nonvir	00h	PBS[CHL]	
21	0.05345576	nonvir	00h	PBS[CHL]	
31	0.19230769	vir	00h	PBS[CHL]	
61	0.01269394	vir	00h	PBS[CHL]	
41	0.13353293	nonvir	24h	PBS[CHL]	
51	0.09253887	nonvir	24h	PBS[CHL]	
91	0.12151616	vir	24h	PBS[CHL]	
101	0.09302326	vir	24h	PBS[CHL]	
71	0.04709176	nonvir	48h	PBS[CHL]	
81	0.10197342	nonvir	48h	PBS[CHL]	
111	0.02941740	vir	48h	PBS[CHL]	
121	0.05617397	vir	48h	PBS[CHL]	
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
SRH\$x1	1	0.03671	0.03671	5.323	0.0325 *
SRH\$x2	2	0.03256	0.01628	2.360	0.1215
SRH\$x3	1	0.00662	0.00662	0.960	0.3396
Residuals	19	0.13104	0.00690		

Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = SRH\$y ~ SRH\$x1 + SRH\$x2 + SRH\$x3, data = SRH)

\$`SRH\$x1`

	diff	lwr	upr	p adj
vir-nonvir	-0.07821962	-0.1491818	-0.007257409	0.0324776

	y	x1	x2	x3
1	0.103755334	nonvir	00h	RAP
2	0.132384870	nonvir	00h	RAP
5	0.004481684	vir	00h	RAP
6	0.051511212	vir	00h	RAP
3	0.164159144	nonvir	24h	RAP
4	0.149456522	nonvir	24h	RAP
9	0.034338941	vir	24h	RAP
10	0.087540927	vir	24h	RAP
7	0.101345618	nonvir	48h	RAP
8	0.112999799	nonvir	48h	RAP
11	0.106686332	vir	48h	RAP
12	0.018926627	vir	48h	RAP
13	0.098494227	nonvir	00h	DMSO[RAP]
21	0.116089264	nonvir	00h	DMSO[RAP]
51	0.012411348	vir	00h	DMSO[RAP]
61	0.000000000	vir	00h	DMSO[RAP]
31	0.149321267	nonvir	24h	DMSO[RAP]
41	0.133112400	nonvir	24h	DMSO[RAP]
91	0.059392655	vir	24h	DMSO[RAP]
101	0.000000000	vir	24h	DMSO[RAP]
71	0.148951767	nonvir	48h	DMSO[RAP]
81	0.145159021	nonvir	48h	DMSO[RAP]
111	0.024645303	vir	48h	DMSO[RAP]

121 0.028224439 vir 48h DMSO[RAP]

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)

SRH\$x1 1 0.05293 0.05293 75.499 4.81e-08 ***

SRH\$x2 2 0.00429 0.00215 3.061 0.0704 .

SRH\$x3 1 0.00096 0.00096 1.369 0.2564

Residuals 19 0.01332 0.00070

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = SRH\$y ~ SRH\$x1 + SRH\$x2 + SRH\$x3, data = SRH)

\$`SRH\$x1`

diff lwr upr p adj

vir-nonvir -0.09392248 -0.1165466 -0.07129835 0

y x1 x2 x3

1 0.040430589 nonvir 00h SBI

2 0.048863523 nonvir 00h SBI

3 0.156250000 vir 00h SBI

4 0.029707296 vir 00h SBI

5 0.116945532 nonvir 24h SBI

6 0.105474899 nonvir 24h SBI

9 0.030894077 vir 24h SBI

10 0.000000000 vir 24h SBI

7 0.099046447 nonvir 48h SBI

8 0.141820212 nonvir 48h SBI

11 0.035614880 vir 48h SBI

12 0.057387257 vir 48h SBI

13 0.079198288 nonvir 00h DMSO[SBI]

21 0.141610974 nonvir 00h DMSO[SBI]

31 0.000000000 vir 00h DMSO[SBI]

41 0.102888087 vir 00h DMSO[SBI]

51 0.072932831 nonvir 24h DMSO[SBI]
 61 0.103826674 nonvir 24h DMSO[SBI]
 91 0.210615952 vir 24h DMSO[SBI]
 101 0.000000000 vir 24h DMSO[SBI]
 71 0.065939514 nonvir 48h DMSO[SBI]
 81 0.052235868 nonvir 48h DMSO[SBI]
 111 0.041675988 vir 48h DMSO[SBI]
 121 0.009586424 vir 48h DMSO[SBI]

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
SRH\$x1	1	0.00646	0.006458	1.994	0.174
SRH\$x2	2	0.00124	0.000620	0.191	0.827
SRH\$x3	1	0.00001	0.000014	0.004	0.949
Residuals	19	0.06155	0.003239		

AUTOFAGIA

	y	x1	x2	x3
1	0.0097564783	nonvir	00h	CHL
2	0.0120143149	nonvir	00h	CHL
3	0.0181818182	vir	00h	CHL
4	0.0069930070	vir	00h	CHL
5	0.0000000000	nonvir	24h	CHL
6	0.0022522523	nonvir	24h	CHL
7	0.0000000000	vir	24h	CHL
8	0.0000000000	vir	24h	CHL
9	0.0219386783	nonvir	00h	PBS[CHL]
10	0.0123374235	nonvir	00h	PBS[CHL]
11	0.0000000000	vir	00h	PBS[CHL]
12	0.0170316302	vir	00h	PBS[CHL]
13	0.0004110903	nonvir	24h	PBS[CHL]
14	0.0002162162	nonvir	24h	PBS[CHL]
15	0.0055583628	vir	24h	PBS[CHL]
16	0.0231227283	vir	24h	PBS[CHL]

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
SRH\$x1	1	0.00000089	8.940e-06	0.151	0.7046
SRH\$x2	1	0.0002780	2.780e-04	4.688	0.0512 .
SRH\$x3	1	0.0000617	6.169e-05	1.040	0.3279
Residuals	12	0.0007116	5.930e-05		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	y	x1	x2	x3	
1	0.0000000000	nonvir	00h		RAP
2	0.0103004292	nonvir	00h		RAP
3	0.0080116533	vir	00h		RAP
4	0.0000000000	vir	00h		RAP
5	0.0000000000	nonvir	24h		RAP
6	0.0013736264	nonvir	24h		RAP
7	0.0062133241	vir	24h		RAP
8	0.0100000000	vir	24h		RAP
9	0.0124113475	nonvir	00h	DMSO	[RAP]
10	0.0165316045	nonvir	00h	DMSO	[RAP]
11	0.0124653740	vir	00h	DMSO	[RAP]
12	0.0222222222	vir	00h	DMSO	[RAP]
13	0.0009302326	nonvir	24h	DMSO	[RAP]
14	0.0000000000	nonvir	24h	DMSO	[RAP]
15	0.0000000000	vir	24h	DMSO	[RAP]
16	0.0070558050	vir	24h	DMSO	[RAP]

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
SRH\$x1	1	0.0000373	3.727e-05	1.119	0.3111
SRH\$x2	1	0.0001986	1.986e-04	5.959	0.0311 *
SRH\$x3	1	0.0000797	7.973e-05	2.393	0.1479
Residuals	12	0.0003999	3.332e-05		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = SRH\$y ~ SRH\$x1 + SRH\$x2 + SRH\$x3, data = SRH)

\$`SRH\$x2`

	diff	lwr	upr	p adj
24h-00h	-0.007046205	-0.01333508	-0.0007573356	0.0310898

	y	x1	x2	x3
1	0.0152678652	nonvir	00h	SBI
2	0.0089945526	nonvir	00h	SBI
3	0.0193236715	vir	00h	SBI
4	0.0104712042	vir	00h	SBI
5	0.0004960317	nonvir	24h	SBI
6	0.0000000000	nonvir	24h	SBI
7	0.0190026247	vir	24h	SBI
8	0.0080783354	vir	24h	SBI
9	0.0082725743	nonvir	00h	DMSO[SBI]
10	0.0102755722	nonvir	00h	DMSO[SBI]
11	0.1093750000	vir	00h	DMSO[SBI]
12	0.0000000000	vir	00h	DMSO[SBI]
13	0.0006621640	nonvir	24h	DMSO[SBI]
14	0.0000000000	nonvir	24h	DMSO[SBI]
15	0.0030794799	vir	24h	DMSO[SBI]
16	0.0099642790	vir	24h	DMSO[SBI]

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
SRH\$x1	1	0.001145	0.0011446	1.773	0.208
SRH\$x2	1	0.001237	0.0012372	1.916	0.191
SRH\$x3	1	0.000225	0.0002250	0.348	0.566
Residuals	12	0.007748	0.0006456		

	marcador	P-value do tratamento	P-value do tempo	P-value do marcador	P-value interação tratamento*tempo
sbi_dms	annex	0.70	0.38	0.33	0.34
sbi_dms	aad	0.69	0.36	0.25	0.37
sbi_dms	apop_double	0.86	0.64	0.78	0.65
sbi_dms	lc3	0.71	0.25	0.68	0.29
sbi_dms	p62	0.79	0.44	0.74	0.54
sbi_dms	autof_double				
sbi	annex	0.98	0.72	0.32	0.26
sbi	aad	0.93	0.82	0.41	0.22
sbi	apop_double	0.98	0.76	0.89	0.25
sbi	lc3	0.78	0.64	0.30	0.22
sbi	p62	0.79	0.66	0.40	0.22
sbi	autof_double	0.27	0.43	0.73	
chl_pbs	annex	0.43	0.42	0.76	0.52
chl_pbs	aad	0.50	0.57	0.66	0.79
chl_pbs	apop_double	0.31	0.30	0.17	0.62
chl_pbs	lc3	0.07	0.04	0.01	0.79
chl_pbs	p62	0.18	0.17	0.10	0.80
chl_pbs	autof_double	0.77			
chl	annex	0.39	0.37	0.95	0.53
chl	aad	0.46	0.29	0.17	0.13
chl	apop_double	0.40	0.38	0.72	0.70
chl	lc3	0.68	0.31	0.28	0.30

chl	p62	0.12	0.14	0.66	0.08
chl	autof_double				
rap_dms	annex	0.80	0.49	0.62	0.53
rap_dms	aad	0.64	0.30	0.23	0.56
rap_dms	apop_double	0.84	0.57	0.98	0.66
rap_dms	lc3	0.33	0.06	0.39	0.10
rap_dms	p62	0.82	0.31	0.83	0.98
rap_dms	autof_double				
rap	annex	0.95	0.45	0.53	0.64
rap	aad	0.85	0.22	0.77	0.05
rap	apop_double	0.95	0.41	0.62	0.37
rap	lc3	0.83	0.41	0.81	0.51
rap	p62	0.83	0.42	0.59	0.67