



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

KAMILA GENUINO SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES MOLECULARES
POTENCIALMENTE ASSOCIADOS COM A INFECÇÃO DE
LINHAGENS DE CÉLULAS DE INSETO PELO VÍRUS ZIKA**

Recife
2024

KAMILA GENUINO SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES MOLECULARES
POTENCIALMENTE ASSOCIADOS COM A INFECÇÃO DE
LINHAGENS DE CÉLULAS DE INSETO PELO VÍRUS ZIKA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Tatiany Patricia Romão
Coorientador: MSc. Yuri Mouzinho Ramos Tanaka

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

SOARES, KAMILA GENUINO.

IDENTIFICAÇÃO DE FATORES MOLECULARES POTENCIALMENTE ASSOCIADOS COM A INFECÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS DE INSETO PELO VÍRUS ZIKA / KAMILA GENUINO SOARES. - Recife, 2024.

61 p. : il., tab.

Orientador(a): TATIANY PATRÍCIA ROMÃO

Coorientador(a): YURI MOUZINHO RAMOS TANAKA

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Proteínas do envelope viral. 2. Infecções por arbovírus. 3. Proteínas de insetos. 4. Ligação proteica. I. ROMÃO, TATIANY PATRÍCIA. (Orientação). II. TANAKA, YURI MOUZINHO RAMOS. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

KAMILA GENUINO SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES MOLECULARES
POTENCIALMENTE ASSOCIADOS COM A INFECÇÃO DE
LINHAGENS DE CÉLULAS DE INSETO PELO VÍRUS ZIKA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 29/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Departamento de Entomologia

MsC. Milena Danielle Oliveira Cordeiro
Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de virologia (Lavite)

Dra. Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE

Dedico este trabalho a Deus, que me acompanha em todos os passos da minha jornada, aos meus pais Wagner e Marluce e meu irmão Raphael que formam a minha maior base de força, apoio e inspiração para atingir meus objetivos. Também dedico ao meu avô Pedro, que muito lembro da sua felicidade em me ver entrar na faculdade e sinto falta todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me ensinar tanto e me mostrar que posso tudo confiar.

Agradeço à minha orientadora Tatiany Romão pela oportunidade de aprendizado e confiança no meu trabalho, pela sua disponibilidade em todos os processos do projeto, ensinamentos e apoio que vai além do acadêmico. É uma pessoa que contagia as pessoas ao redor com sua energia e inspira seus alunos com toda a inteligência que possui.

Ao meu coorientador Yuri Tanaka por toda a paciência em me ensinar desde os primeiros passos na bancada e fornecer acompanhamento total. Ao seu lado pude crescer profissionalmente da forma mais importante que é a superação de desafios. Sou muito grata pelos seus direcionamentos e por toda a ajuda, reconheço como o melhor coorientador que poderia ter e que vai continuar contribuindo muito para a formação de outras pessoas.

Agradeço também a todos que compõem o departamento de Entomologia como Suzy, Derciliano, Juliana, Clara e Marcelo que são pessoas bastante solícitas.

Gostaria de agradecer a Milena que foi essencial na compreensão de novas metodologias e disposição e tempo empenhado em ajudar nesse projeto.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelo financiamento e oportunidade de realizar esse trabalho que vem a colaborar na construção do conhecimento na área.

A todo o pessoal da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco que me permitiram ter a experiência num hospital de grande reconhecimento e onde pude conhecer pessoas extraordinárias como Vera Lúcia que eu fico muito feliz em ter cruzado o seu caminho. Agradeço também ao pessoal do laboratório de Microbiologia do Instituto Keizo Asami por me acolher de braços abertos nesse curto tempo. Levarei cada aprendizado e boa conversa que tive com todas as pessoas durante esse período de estágio.

Agradeço a minha família que sempre me apoiou muito, prezando pela minha felicidade e conquista dos meus sonhos. A minha mãe Marluce e meu pai Wagner por todo cuidado que foi essencial para formar meus valores e quem eu sou hoje. Por estarem presentes e dispostos a me ajudarem nos meus momentos mais difíceis durante essa jornada. É graças a vocês que posso almejar os meus objetivos e

sempre me levantar novamente.

A todos os meus colegas que estiveram comigo durante esse curso. Em especial, agradeço às minhas melhores amigas Gabriela e Patrícia que participam da minha vida desde antes da graduação e após ela. Por serem pessoas que eu posso contar sempre e nosso vínculo se manterá forte, que mesmo com as dificuldades podemos sempre nos reencontrar e apoiar. Sou extremamente grata a Gabriela por me ajudar na motivação em escrever este trabalho, devo muito às nossas conversas e formas de tentar animar uma a outra quando precisamos, é uma pessoa que admiro por tentar ajudar a todos no seu alcance sem distinção.

Gostaria de agradecer também a todas as pessoas que passaram no meu caminho e contribuíram para a construção do meu trabalho.

SOARES, Kamila Genuino. **Identificação de fatores moleculares potencialmente associados com a infecção de linhagens de células de inseto pelo vírus Zika.** 2024. 61 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

O ressurgimento das arboviroses constitui uma ameaça contínua para a saúde pública devido a altas taxas de disseminação e expansão geográfica dos seus mosquitos vetores, o que resulta em complicações clínicas e impactos na economia global. O *status* de transmissão do ZIKV é uma preocupação de interesse internacional dado ao seu potencial de ressurgir como uma epidemia. A falta de esclarecimentos sobre a biologia da interação vírus-vetor nos levou a investigar as bases moleculares *in vitro* da interação ZIKV-receptor. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar potenciais ligantes da proteína do envelope recombinante do ZIKV a partir de extratos proteicos das linhagens celulares C6/36 (*Aedes albopictus*) suscetível ao ZIKV e Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) não suscetível a vários *Flavivírus*, através de ensaios de ligação proteína-proteína seguidos de espectrometria de massas e análises *in silico*. Para a execução, extratos de proteínas de membrana celular foram obtidas pelo *kit Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific)* e avaliadas qualitativamente e quantitativamente, seguidas de ensaios de interação do tipo *pull-down*. A proteína do envelope (E) recombinante do ZIKV (ENV-GST) produzida, purificada e dialisada foi quantificada por curva de BSA e imunodetectada por *western-blotting* com anticorpo comercial "*Mouse Anti-Flavivirus Envelope Protein Antibody 4G2*". No ensaio de ligação proteína-proteína, a ENV-GST imobilizada em resina de glutathione sepharose® 4B (GE Healthcare) foi incubada individualmente com os extratos de proteínas de membrana de cada linhagem celular em réplicas biológicas. As proteínas coprecipitadas ligantes da ENV-GST, passaram por migração eletroforética em SDS-PAGE e excisadas para análise em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema *Orbitrap Exploris 120*. Além disso, os resultados de SDS-PAGE e *western-blotting* evidenciaram a integridade das amostras proteicas extraídas e especificidade do ensaio de ligação de *pull-down* em captar proteínas ligantes da ENV-GST. A espectrometria de massas identificou 165 proteínas totais, estas, após filtragem e normalização, resultaram em 9 proteínas ligantes das amostras de C6/36 e 11 para Sf9. Alguns ligantes candidatos evidenciados em Sf9 foram *Glutathione Transferase*, *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* e *Prostaglandin reductase 1*, para C6/36 *Arginine- tRNA ligase*, *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* sendo a *ADP/ATP translocase* identificada em ambas as células C6/36 e Sf9. Análises *in silico* foram conduzidas através da predição das estruturas das proteínas ligantes pelo *AlphaFold2* seguidas de análises de *docking* molecular, onde pudemos validar a afinidade de ligação de alguns ligantes à proteína E do ZIKV. Em conclusão, conseguimos identificar algumas moléculas candidatas a ligantes com potencial participação durante o ciclo viral de interação com as células de inseto.

Palavras-chave: Proteínas do envelope viral, infecções por arbovírus, proteínas de insetos, ligação proteica.

SOARES Kamila Genuino. **Identification of molecular factors potentially associated with the infection of insect cell lines by the Zika virus.** 2024. 61 pages. Completion of course work (Graduate in Biomedicine) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

The resurgence of arboviruses constitutes an ongoing threat to public health due to high rates of spread and geographic expansion of their mosquito vectors, which results in clinical complications and impacts on the global economy. The transmission status of ZIKV is a concern of international interest given its potential to reemerge as an epidemic. The lack of clarification about the biology of the virus-vector interaction led us to investigate the *in vitro* molecular basis of the ZIKV-receptor interaction. Thus, the present study aimed to identify potential ligands of the ZIKV recombinant envelope protein from protein extracts of the C6/36 (*Aedes albopictus*) cell lines susceptible to ZIKV and Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) not susceptible to several Flaviviruses, through protein-protein binding assays followed by mass spectrometry and *in silico* analyses. For the execution, cell membrane protein extracts were obtained by the Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) and evaluated qualitatively and quantitatively, followed by pull-down interaction assays. The recombinant ZIKV envelope protein (E) produced, purified and dialyzed was quantified by BSA curve and immunodetected by western blotting with commercial antibody "Mouse Anti-Flavivirus Envelope Protein Antibody 4G2". In the protein-protein binding assay, ENV-GST immobilized in glutathione sepharose® 4B resin (GE Healthcare) was individually incubated with the membrane protein extracts of each cell line in biological replicates. The ENV-GST ligand coprecipitated proteins underwent electrophoretic migration in SDS-PAGE and excised for analysis in liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC MS/MS) in the *Orbitrap Exploris 120* system. In addition, the results of SDS-PAGE and western-blotting showed the integrity of the extracted protein samples and the specificity of the pull-down binding assay in capturing ENV-GST binding proteins. Mass spectrometry identified 165 total proteins, which, after filtering and normalization, resulted in 9 ligand proteins from the C6/36 samples and 11 for Sf9. Some candidate ligands evidenced in Sf9 were Glutathione Transferase, Heat shock 70 kDa protein cognate 5 and Prostaglandin reductase 1, for C6/36 Arginine-tRNA ligase, Heat shock 70 kDa protein cognate 5 and ADP/ATP translocase was identified in both C6/36 and Sf9 cells. The results of the study were conducted through the prediction of the structures of the ligand proteins by AlphaFold2 followed by molecular docking analyses, where we were able to validate the binding affinity of some ligands to the E protein of ZIKV. In conclusion, we were able to identify some ligand candidate molecules with potential participation during the viral cycle of interaction with insect cells.

Keywords: Viral envelope proteins, arbovirus infections, insect proteins, protein binding.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fêmea do mosquito adulto <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 2 – Fêmea do mosquito adulto <i>Aedes albopictus</i>	19
Figura 3 – Ciclo de replicação dos <i>Flavivírus</i>	21
Figura 4 – Distribuição de casos de infecção pelo ZIKV.	22
Figura 5 – Organização genômica do vírus ZIKV.	24
Figura 6 – Estrutura do Vírion formado durante o ciclo biológico do vírus ZIKV.....	25
Figura 7 – Predição da proteína do Envelope do ZIKV.	26
Figura 8 – Microscopia óptica de luz invertida dos cultivos celulares.....	37
Figura 9 – Avaliação do perfil de bandas proteicas (membrana e citosol) por SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie.	38
Figura 10 – Gel SDS-PAGE 10% da quantificação da proteína do envelope pela curva de diluição seriada do BSA.....	39
Figura 11 – Gel de SDS-PAGE 10% do ensaio de <i>pull-down</i>	41
Figura 12 – Western Blotting do ensaio de <i>pull-down</i>	42
Figura 13 – Plot de Ramachandran para as estruturas preditas das proteínas candidatas a ligantes em C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>).....	46
Figura 14 – Plot de Ramachandran para as estruturas preditas das proteínas candidatas a ligantes em Sf9 (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	47
Figura 15 – Visualização do <i>docking</i> para DC-SIGN, 1º modelo.....	50
Figura 16 – Visualização do <i>docking</i> , ligante <i>Heat shock protein 70 kDa cognate 5</i> , 1º modelo em C6/36.....	51
Figura 17 – Visualização <i>docking</i> , ligante <i>Heat shock protein 70 kDa cognate 5</i> , 2º modelo em Sf9.	51
Figura 18 – Visualização <i>docking</i> , ligante <i>glutathione transferase</i> , 2º modelo em Sf9.	52
Figura 19 – Visualização <i>docking</i> , ligante <i>ATP/ADP translocase</i> , 1º modelo em C6/36.....	52
Figura 20 – Visualização <i>docking</i> , ligante <i>ATP/ADP translocase</i> , 3º modelo em Sf9.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação das amostras de proteínas pelo NanoDrop, método A280.	39
Tabela 2 – Proteínas ligantes candidatas de <i>Aedes albopictus</i> selecionadas após filtragem.....	43
Tabela 3 – Proteínas ligantes candidatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> selecionadas após filtragem.....	44
Tabela 4 – Ranking de energia livre dos modelos produzidos no <i>docking</i> molecular com os ligantes candidatos de C6/36, <i>Aedes albopictus</i> , selecionados após filtragem.	48
Tabela 5 – Ranking de energia livre dos modelos produzidos no <i>docking</i> molecular com os ligantes candidatos de Sf9, <i>Spodoptera frugiperda</i> , selecionados após filtragem.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+ssRNA	Material genético de fita simples positivo
DENV	Vírus da dengue
ZIKV	Vírus Zika
YFV	Vírus da febre amarela
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
JEV	Vírus da encefalite japonesa
SLE	Vírus da encefalite St. Louis
OMS	Organização Mundial da Saúde
ESPII	Emergência de Saúde Pública internacional
DC-SIGN	Proteínas não integrinas de aderência intercelular específica de células dendríticas
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
C	Proteína do capsídeo
E	Proteína do envelope
prM	Proteína de membrana
RE	Retículo endoplasmático
ORF	Quadro aberto de leitura único
ORV	Organelas de replicação viral
PV	Pacotes de vesículas
DI	Domínio central
DII	Domínio de dimerização
DIII	Domínio semelhante à imunoglobulina
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
SFB	Soro Fetal Bovino
RT-PCR	Reações de transcrição reversa
ENV-GST	Proteína E recombinante fusionada a GST
ICC	Instituto Carlos Chagas
HCV	Vírus da hepatite C
HSP	<i>Heat shock proteins</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ARBOVIROSES, SAÚDE PÚBLICA E PROCESSO DE INFECÇÃO NOS VETORES	17
2.2 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE	19
2.3 VÍRUS ZIKA	21
2.3.1 Epidemiologia: Distribuição e Sintomas	21
2.3.2 Linhagens do Vírus	23
2.3.3 Proteínas Estruturais e Não Estruturais	23
2.3.4 Proteína do Envelope	25
2.3.5 Entrada Viral.....	27
2.4 FATORES MOLECULARES E RECEPTORES EM <i>FLAVÍRUS</i>	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 CULTURA DE CÉLULAS E VÍRUS	31
4.2 PREPARAÇÕES DE EXTRATOS PROTEICOS DE LINHAGENS CELULARES C6/36 E SF9	31
4.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA E (PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKV) RECOMBINANTE....	32
4.4 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO TIPO <i>PULL-DOWN</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES.....	32
4.4.1 Filtragem e Normalização	33
4.5 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	34
5 RESULTADOS	36

5.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	36
5.2 PREPARAÇÕES DE EXTRATOS PROTEICOS DE LINHAGENS CELULARES C6/36 E SF9.	38
5.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA E (PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKV) RECOMBINANTE ...	39
5.4 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO TIPO <i>PULL-DOWN</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES.....	40
5.5 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	45
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

As doenças emergentes transmitidas por vetores têm chamado atenção da saúde pública devido à sua expansão desproporcional em relação às novas doenças infecciosas (Chala; Hamde, 2021). Entre os principais fatores associados ao descontrole na taxa de crescimento das infecções por doenças transmitidas por vetores estão a globalização, urbanização, mudanças climáticas e a capacidade de adaptação dos patógenos e de seus vetores (Chala; Hamde, 2021). As arboviroses são definidas como doenças ocasionadas pela disseminação do vírus por vetores artrópodes (Allen *et al.*, 2020). Entre a transmissão por artrópodes, a família Flaviviridae demonstra ter um enorme impacto na saúde humana e na economia em escala global, tendo como protagonistas um grupo de vírus envelopados com material genético de fita simples de sentido positivo (+ssRNA), medindo cerca de 40-60 nanômetros de diâmetro, esta família inclui patógenos com tropismo para animais humanos e não humanos (Van Leur *et al.*, 2021).

O gênero *Flavivirus* possui uma ampla variedade de espécies com capacidade de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo constituída, por exemplo, pelos vírus dengue (DENV), vírus Zika (ZIKV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), encefalite japonesa (JEV) e encefalite St. Louis (SLE). Estes patógenos são conhecidos por causar relevantes epidemias na população humana, com o desenvolvimento de doenças incapacitantes de acometimento articular, neural e doenças autoimunes, e por estar atrelado à má formação fetal e casos de microcefalias (Van Leur *et al.*, 2021). Ainda existe uma enorme dificuldade em desenvolver vacinas e drogas antivirais contra as enfermidades ocasionadas pelos Flavivirus, devido à possibilidade de reação cruzada de anticorpos e infecções por diferentes vírus do mesmo gênero. Outro ponto que prejudica a prevenção dessas enfermidades é a dificuldade no controle populacional dos mosquitos vetores (Pierson; Diamond, 2020; Chan *et al.*, 2022; Kuhn *et al.*, 2023).

No contexto histórico, o ZIKV foi isolado pela primeira vez no macaco *Rhesus* em Uganda no ano de 1947, com poucos casos espalhados na África e na Ásia após sua identificação. Em 2007 houve o primeiro surto de ZIKV na Micronésia, seguidos por surtos registrados em 2013 na Polinésia Francesa e no ano de 2015 no Brasil (Giraldo; Gonzalez-Orosco; Rajsbaum, 2023). Após o surto de ZIKV no Brasil em 2015, e a sua associação ao aumento dos casos de microcefalia e outras

malformações congênitas em recém-nascidos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou Emergência de Saúde Pública de importância internacional (ESPII) (Safádi; Almeida, 2019; Pepe *et al.*, 2021). A epidemia causou impacto socioeconômico nos grupos vulneráveis e as medidas preventivas foram insuficientes, manifestando também a necessidade de desenvolvimento científico e tecnológico para os estudos sobre as arboviroses (Pepe *et al.*, 2021).

Sabe-se que a entrada viral nas células hospedeiras ocorre pela interação do vírus com proteínas e fatores de superfície celular e sua consecutiva internalização mediada pela endocitose, e para os *Flavivírus* esta etapa depende do contato da proteína do envelope com seus receptores e correceptores de ligação (Rey; Stiasny; Heinz, 2017). Alguns fatores moleculares como receptores de lectinas do tipo-C, glicosaminoglicanos, DC-SIGN (proteínas não integrinas de aderência intercelular específica de células dendríticas), proteína de regulação da glicose (GRP78) e família de receptor TIM (TIM-1 e TIM-4) e TAM (AXL e Tyro3), foram reportados por possuir possível relação na entrada do ZIKV nas células de hospedeiros (Van Leur *et al.*, 2021; Wichit *et al.*, 2021). A poliubiquitinação é uma modificação pós-traducional estudada na proteína E dos *Flavivírus* que foi relatada como uma característica que contribui para a ligação do ZIKV ao receptor TIM-1 dos hospedeiros vertebrados. Apesar do desconhecimento das suas funções, diferentes fatores associados aos seus respectivos receptores podem ser determinantes para a entrada em um tipo celular ou tecido (Giraldo *et al.*, 2020).

A utilização de linhagens celulares de insetos para o estudo de interação viral, é, acima de tudo, uma ferramenta para entender os processos de entrada e replicação viral *in vitro*. Nesse contexto, a linhagem celular C6/36 é um modelo comumente utilizado para o estudo da interação e internalização de arbovírus, além de auxiliar nos estudos que visam o desenvolvimento de terapêuticas (Miller *et al.*, 2018). Esta linhagem é um clone obtido de estágios larvais de *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660) amplamente utilizada nos estudos *in vitro*, sendo um modelo celular clássico para o isolamento e propagação viral, assim como para os estudos de interação e infecção das arboviroses devido a sua alta permissividade e suscetibilidade à infecção, sobretudo, de *Flavivírus* (Miller *et al.*, 2018). Por outro lado, a linhagem Sf9 (ATCC CRL-1711), derivada do tecido ovariano do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* pertencente à família Noctuidae, é amplamente utilizada como sistema de produção de proteínas recombinantes de baculovírus e usualmente empregada para estudar

eventos de entrada viral. A linhagem mostrou um perfil de infecção persistente através de efeitos citopáticos (ECP) e imunofluorescência apenas para os *Flavivirus* SLE e JEV (Zhang *et al.*, 1993; Fu; Zhang, 1996; Geisler; Jarvis, 2018). No entanto, para outros *Flavivirus*, como YFV, DENV-1 e DENV-2 não foi possível identificar a infecção viral após a inoculação, sem observação de efeito citopático e partículas virais internalizadas (Zhang *et al.*, 1994).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo identificar, de forma comparativa, proteínas ligantes de ZIKV em células de insetos, especialmente, os ligantes proteicos potencialmente envolvidos na entrada viral determinantes para o *status* de suscetibilidade celular à infecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARBOVIROSES, SAÚDE PÚBLICA E PROCESSO DE INFECÇÃO NOS VETORES

Os arbovírus, do inglês *arthropode-borne viruses*, são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos cujo ciclo de transmissão possui hospedeiros vertebrados suscetíveis, além de possuir grande importância na saúde pública. Esses patógenos diferem em agentes etiológicos com capacidade de ocasionar doenças severas com sintomas persistentes em humanos e a sua possibilidade de reemergência como epidemias (Girard *et al.*, 2020; Pepe *et al.*, 2020). As doenças transmitidas por arbovírus zoonóticos reemergentes crescem rapidamente em relação a outras enfermidades, e de acordo com a OMS estima-se que 17% das doenças infecciosas no mundo são transmitidas por vetores. Alguns desses patógenos emergentes são das famílias Bunyaviridae, Flaviviridae e Togaviridae que estão majoritariamente associadas à manifestação de complicações de saúde na população (Huang; Higgs; Vanlandigham, 2019; Organização Mundial da Saúde, 2021).

Os arbovírus se disseminam amplamente, e o controle de vetores ainda é a principal ferramenta de combate e prevenção das epidemias causadas por arbovírus, sobretudo, nos países da América Latina. Contudo, a dispersão dos mosquitos atingiu cobertura global indo além das suas áreas restritas iniciais e hoje compreende além do continente africano e o sudeste da Ásia, áreas subtropicais, tropicais e principalmente a região das Américas (Huang; Higgs; Vanlandigham, 2019). Entre os fatores que contribuíram para sua expansão estão a adaptação dos mosquitos a mudanças climáticas e à globalização, resistência a inseticidas, e outros aspectos sociodemográficos que auxiliam na dispersão dos mosquitos (Lwande *et al.*, 2020; Lewis *et al.*, 2023). A competência vetorial se refere à capacidade de um vetor em transmitir os patógenos para um hospedeiro, e essa aptidão está associada a fatores de fenótipo do mosquito, elementos endógenos não-retrovirais e influências genotípicas (Lewis *et al.*, 2023). Assim, as espécies *Aedes aegypti* (Figura 1) e *Aedes albopictus*, transmissores dos vírus Chikungunya, dengue, febre amarela e Zika provaram seu papel na transmissão vetorial, sendo responsáveis pela dispersão dos patógenos, causando sobrecarga nos sistemas de saúde e impactos econômicos, como elevado número de internações hospitalares e acentuadas despesas com cuidados médicos (Näslund *et al.*, 2021).

Figura 1 – Fêmea do mosquito adulto *Aedes aegypti*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2006.

Legenda: Fêmea adulta do mosquito *Aedes aegypti* após realizar o repasto sanguíneo, sobre uma superfície epitelial. A espécie apresenta marcas em curvas brancas prateadas, com padrão distinto.

Nos mosquitos, o processo de infecção tem início a partir do repasto sanguíneo realizado pela fêmea em um hospedeiro infectado e depende de uma passagem bem-sucedida das barreiras físicas do epitélio do intestino médio, glândula salivar e hemocele (Du *et al.*, 2019; Viglietta *et al.*, 2021). Após passar pelas barreiras de infecção, os arbovírus seguem para a replicação nas células epiteliais presentes no intestino médio. Uma vez que os vírions estão formados, estes devem ultrapassar a barreira de escape do intestino médio para infectar outros tecidos (Carpenter; Clem, 2023). A glândula salivar é de suma importância na transmissão vetorial, pois a saliva secretada possui vírions recém-produzidos que podem ser transmitidos para o hospedeiro no repasto sanguíneo, depois de superar a barreira do epitélio das glândulas salivares. Dessa forma, a partir da ingestão do sangue contaminado, o vírus possui a capacidade de disseminar e promover a infecção de todos os tecidos do vetor a partir da evasão das barreiras do epitélio. Com êxito nesses processos, os mosquitos podem inocular os vírus em um novo hospedeiro vertebrado através da hematofagia (Viglietta *et al.*, 2021; Carpenter; Clem, 2023).

Para o *Aedes albopictus* (Figura 2), estudos demonstraram sua efetiva capacidade vetorial para o vírus Chikungunya e replicação em relação ao *Aedes aegypti*, a partir da identificação de uma mutação na posição 226 no gene do envelope 1 (E1) (Lwande *et al.*, 2020). Entretanto, outros mecanismos moleculares no ciclo de infecção não estão totalmente elucidados nas células de inseto, restando proposições de possíveis interações. Uma investigação da competência vetorial, por exemplo, pode contribuir para uma resposta rápida frente a esses vírus emergentes e prevenção das arboviroses. Assim, a escassez de informação sobre seus mecanismos moleculares, seja em relação à sua entrada no hospedeiro ou à infecção e replicação viral nas células do inseto, constitui uma barreira no desenvolvimento de vacinas e antivirais efetivos ao combate desses patógenos transmitidos pelos vetores.

Figura 2 – Fêmea do mosquito adulto *Aedes albopictus*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2003.

Legenda: Fêmea adulta do mosquito tigre-asiático (*Aedes albopictus*) após realizar o repasto sanguíneo, sobre uma superfície epitelial. É possível observar listras brancas bem distribuídas pelo corpo, além disso, possui uma linha única branca ao longo do dorso que o distingue de outros mosquitos.

2.2 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE

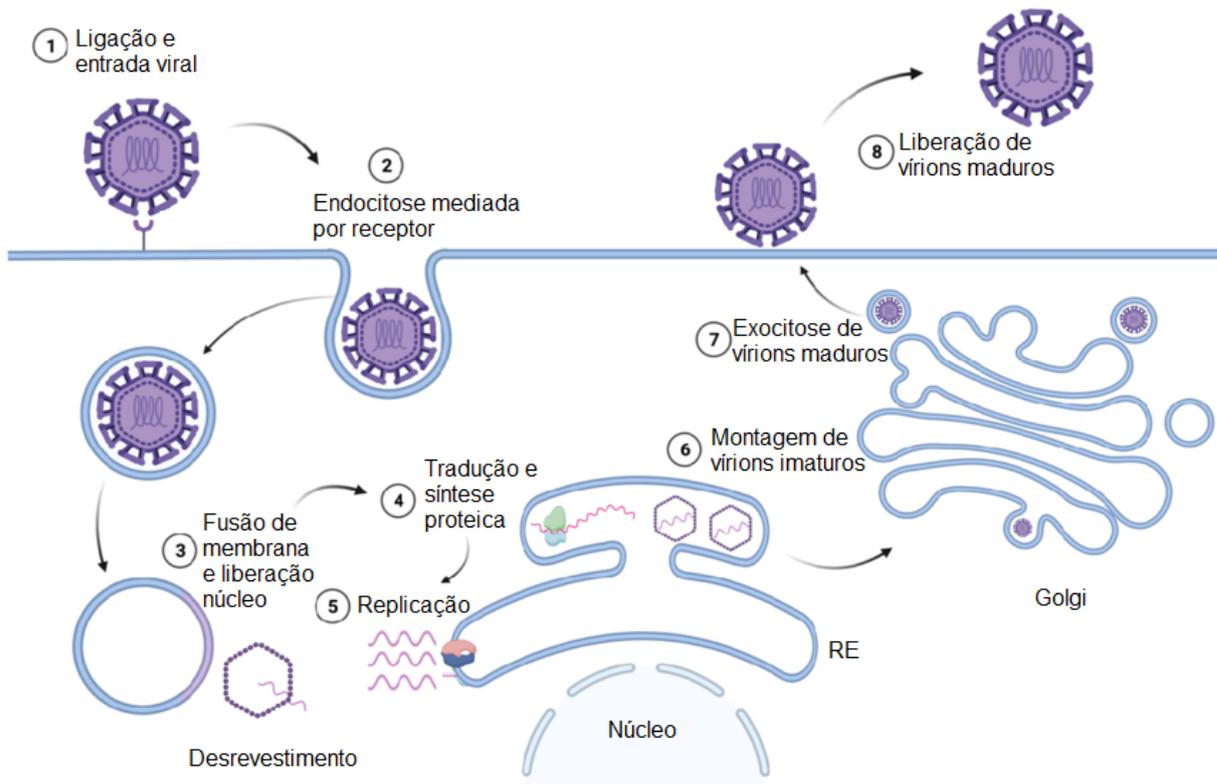
A família Flaviviridae abrange vírus envelopados que apresentam genoma de RNA de fita simples e sentido positivo, alguns com capacidade de ocasionar doenças

em mamíferos (Zhao *et al.*, 2021). O genoma dos membros disponibilizados da Flaviviridae possui tamanho que varia de 9 a 13 kb. Taxonomicamente, essa família possui mais de 97 espécies de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia (2023) e está segmentada em quatro gêneros, *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (Simmonds *et al.*, 2017). Os *Flavivirus* são transmitidos por vetores artrópodes com grande importância clínica devido à sua patogênese em humanos. Esse gênero inclui os reconhecidos vírus DENV, ZIKV, YFV, WNV, JEV e SLE, responsáveis por causar distintas enfermidades potencialmente graves como febre hemorrágica, acometimento articular incapacitante e manifestações neurológicas severas. Além disso, o neurotropismo de alguns arbovírus é uma característica capaz de impactar o desenvolvimento fetal, incidindo desde o aumento de abortos e microcefalia até a morte após o nascimento (Zhao *et al.*, 2021; Van Leur *et al.*, 2021).

O ciclo replicativo dos *Flavivirus* (Figura 3) segue o proposto para os vírus envelopados. A primeira etapa consiste na ligação do vírus à superfície celular do hospedeiro suscetível. Sua posterior internalização depende do processo de endocitose mediada por Clatrina e co-receptores (Van den Elsen; Quek; Luo, 2021). A presença do pH ácido durante a endocitose promove uma alteração conformacional na proteína do envelope para um estado de menor energia, favorecendo a fusão de membranas e preservando sua estrutura nos endossomos (Rey; Stiasny; Heinz, 2017). Após a entrada na célula, o nucleocapsídeo liberado no citoplasma é degradado, expondo o RNA viral que será traduzido em poliproteínas no retículo endoplasmático rugoso pelos ribossomos. Os vírions são compostos por três proteínas estruturais, proteína do capsídeo (C), proteína do envelope (E) e proteína de membrana (prM) e sete proteínas não estruturais. As proteínas não estruturais coordenam a replicação ao induzir invaginações do retículo endoplasmático e formar as organelas de replicação. Neste local, a replicação de novas fitas positivas do genoma viral ocorre a partir da produção de fitas complementares negativas de RNA. Posteriormente, ocorre a montagem dos vírions imaturos, no qual o genoma viral é sintetizado e maturado com adição do capsídeo e envelope. Ao final da montagem, os vírions são secretados pelo aparato de Golgi, e na presença do pH ácido são promovidos rearranjos conformacionais nas proteínas prM-E. Essas partículas também passam por uma clivagem mediada por furina na região N-terminal da prM, transformando em proteína M (Zhao *et al.*, 2021). Esse processo de maturação promove as últimas modificações conformacionais na proteína E para que eles sejam

exocitados como partícula viral madura (Van Den Elsen; Quek; Luo, 2021).

Figura 3 – Ciclo de replicação dos *Flavivírus*.



Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2023

Legenda: O ciclo de replicação dos *Flavivírus* tem início com o reconhecimento da partícula viral e ligação à superfície celular do hospedeiro, depois, o vírus é internalizado mediante endocitose formando uma vesícula, a fusão com membrana do endossomo induz a liberação do material genético viral no citoplasma que é traduzido no ribossomo. Por fim, são montadas novas partículas virais que após a maturação, com mudanças conformacionais no aparato de Golgi, são liberadas por exocitose.

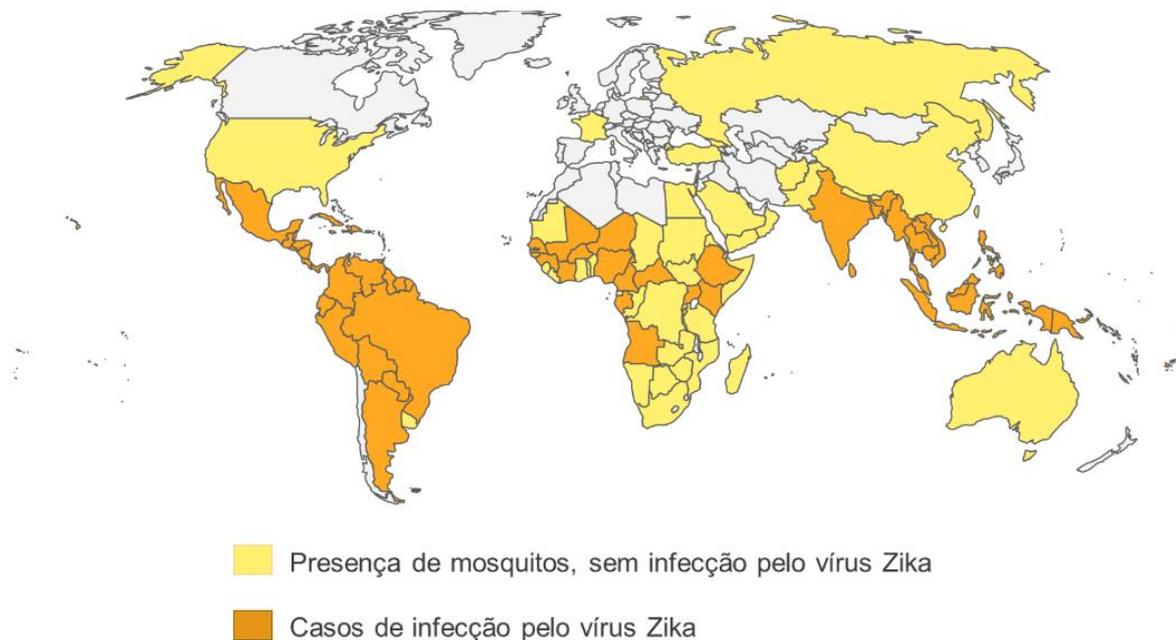
2.3 VÍRUS ZIKA

2.3.1 Epidemiologia: Distribuição e Sintomas

O ZIKV é um vírus de RNA, envelopado e esférico, que foi primeiramente identificado no macaco da espécie *Rhesus*, em Uganda, no ano de 1947. No ano seguinte, foi detectada a presença do vírus no mosquito *Aedes africanus*. A disseminação do ZIKV teve continuidade pelo continente africano em 1952 e em 1983 foi registrada a ocorrência de uma nova cepa viral na Ásia. Novos surtos ocorreram entre 2007 e 2014 na Micronésia, Polinésia Francesa e ilhas do Pacífico, culminando

na maior crise de saúde pública ocasionada por esse vírus em maio de 2015 no Brasil (Pielnaa, 2020). O ZIKV também foi isolado nas espécies do mosquito urbano *Aedes* e no mosquito doméstico do gênero *Culex*, as espécies são *Aedes aegypti*, *Aedes africanus*, *Aedes albopictus*, *Aedes hensili* e *Culex quinquefasciatus* (Amraoui *et al.*, 2019). De acordo com os informativos do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2024), a transmissão de ZIKV atualmente se concentra majoritariamente na região das Américas (América central, América do Norte e América do Sul), além das regiões de risco, que incluem África, Ásia, Caribe e as Ilhas do Pacífico (Figura 4). Além disso, outras áreas possuem mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, vetor envolvido na transmissão de diversas arboviroses, mas não há casos de infecção pelo ZIKV reportados nos últimos 12 meses. Outras circunstâncias onde não há casos de infecção é a presença dos vetores em regiões subtropicais e que possuem um enorme e efetivo sistema de vigilância para arboviroses, juntamente com a alta capacidade para testes diagnósticos, como os Estados Unidos e a França (CDC, 2024).

Figura 4 – Distribuição de casos de infecção pelo ZIKV.



Fonte: Própria do autor utilizando dados do *Centers for Disease Control and Prevention*, 2024 e a ferramenta *Simple maps* (<https://simplemaps.com/resources/svg-maps>).

Legenda: Mapa demonstrando distribuição global da presença de mosquito da espécie *Aedes aegypti* e registros de caso de infecção pelo ZIKV. Em amarelo está representada a presença do vetor *Aedes aegypti* no território mas sem registros de casos de ZIKV. Em laranja, há a presença do vetor *Aedes aegypti* e também registros de casos de infecção de ZIKV.

Quando o vírus foi identificado, os sintomas da infecção viral inicialmente se limitavam, de modo geral, à artralgia, febre aguda, mialgia e erupções cutâneas (Liu; Shi; Qin, 2019). Entretanto, com os surtos de 2013 na Polinésia e em 2015 no Brasil, foram reportadas manifestações neurológicas que estariam associadas à patogênese desse vírus (Sáfadi; Almeida, 2019). Em 2016, a OMS sugeriu a forte relação da infecção pelo ZIKV com o aumento no desenvolvimento de microcefalia, síndrome de Guillain-Barré e outros danos cerebrais, fato esse que associado à explosão no número de casos levou a organização a declarar o ZIKV como uma Emergência de Saúde Pública Internacional (ESPI), que requisitou de forma imediata a atenção dos profissionais de saúde (Siddique *et al.*, 2019).

2.3.2 Linhagens do Vírus

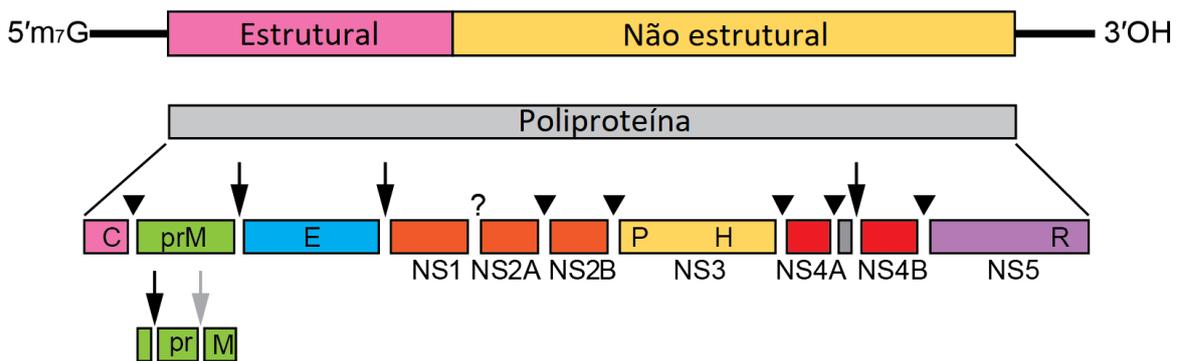
A análise genética comparativa revelou duas linhagens principais do vírus Zika, a Africana e a Asiática. Essas linhagens podem ainda ser subdivididas, a Africana em Oeste e Leste e a Asiática de acordo com seus subclados em linhagem local ou Americana contemporânea (Liu; Shi; Qin, 2019; Pielnaa, 2020). Ainda, o derivado subclado americano demonstrou alta capacidade de disseminação entre a população da América do Sul (King; Irigoyen, 2022).

Em comparação, o estudo conduzido por Putita *et al.* (2020), analisou o crescimento das linhagens africana e asiática de ZIKV e demonstrou que a cepa africana mostrou maior patogenicidade, com efeitos citopáticos mais intensos *in vitro* em células Aag2, C6/36 e Vero, e menor taxa de sobrevivência *in vivo* em camundongos. Já para a linhagem asiática, estudos sugerem que mutações na proteína não estrutural NS1 podem ter contribuído para a maior adaptabilidade e transmissibilidade do ZIKV em mosquitos. Um exemplo é a substituição A188V, que está associada ao aumento da secreção de NS1 no sangue do hospedeiro e conseqüentemente promove a infectividade do vírus em mosquitos (King; Irigoyen, 2022).

2.3.3 Proteínas Estruturais e Não Estruturais

A replicação viral ocorre no citosol dentro de compartimentos de membranas da célula hospedeira. O RNA genômico liberado é traduzido em poliproteínas virais nas superfícies do retículo endoplasmático (RE) para formar uma plataforma adequada de montagem e maturação. O genoma do ZIKV é composto por um quadro aberto de leitura único, do inglês, *Open reading frame* (ORF) (Figura 5) que codifica uma poliproteína posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, E e prM) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), após processamento por proteases virais e enzimas celulares do hospedeiro. As proteínas estruturais integram a partícula viral e promovem a interação com a superfície para entrada na célula. As proteínas não estruturais permitem a replicação e montagem de novos vírions (Figura 6), além de auxiliarem na propagação do vírus dentro da célula pela evasão da resposta imunológica (Ma; Yuan; Yi, 2022; Giraldo; Gonzalez-Orosco; Rajsbaum, 2023). No geral, as proteínas não estruturais induzem rearranjo em membranas do RE, formando invaginações, membranas convolutas e organelas de replicação viral (ORV). Essas proteínas também atuam na regulação dos pacotes de vesículas (PV) formados pelos vírions imaturos e nas ORVs ao suprimir a ativação da imunidade inata, além de induzir o recrutamento de componentes de membrana e demanda de energia (Van Leur *et al.*, 2021).

Figura 5 – Organização genômica do ZIKV.

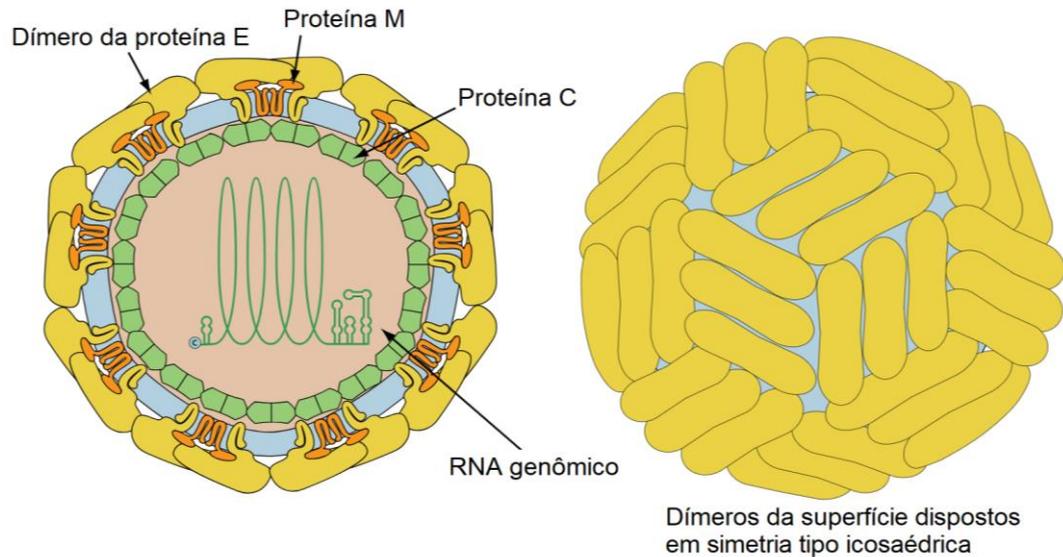


▼NS2B-3 protease ▼Sinal-peptidase ▼Golgi protease ?Peptidases desconhecidas

Fonte: Adaptado de *International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV*. Disponível em: ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus.

Legenda: Organização genômica subdividida em região estrutural e não estrutural. O processamento da poliproteína auxiliado por enzimas presentes resulta em proteínas estruturais e não estruturais. P: protease NS3. H: NS3 RNA helicase. R: NS5 domínio RdRP.

Figura 6 – Estrutura do Vírion formado durante o ciclo biológico do ZIKV.



Fonte: Adaptado de ViralZone, SIB *Swiss Institute of Bioinformatics*. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/6756>.

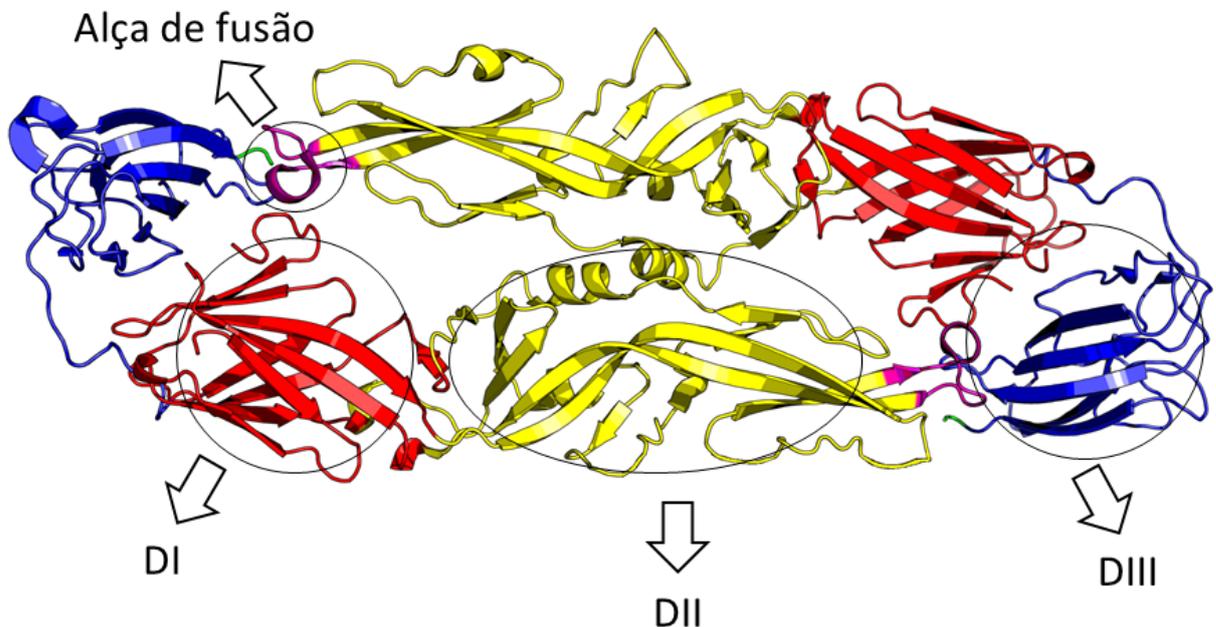
Legenda: Partícula viral envelopada do ZIKV. No interior está disposto o RNA genômico em verde e na superfície as proteínas estruturais C, E e M, em verde, amarelo e laranja, respectivamente. Os dímeros estão dispostos em simetria tipo icosaédrica.

2.3.4 Proteína do Envelope

A proteína E (Figura 7) é a principal proteína envolvida na internalização do vírus e sua replicação, e é a partir da interação com fatores moleculares, receptores e a superfície da célula de um hospedeiro suscetível que o ciclo de infecção pode ser iniciado. A proteína do envelope possui tamanho de aproximadamente 53 kDa e é composta por um ectodomínio N-terminal de aproximadamente 400 resíduos, e um domínio C-terminal de hélices transmembrana e uma cauda, tendo aproximadamente 50 resíduos cada (Hu *et al.*, 2019; Telehany *et al.*, 2020). O domínio N-terminal pode ser segmentado em: domínio central (DI) nos resíduos 1–51, 132–192 e 280–295, responsável pela modificação conformacional, domínio de dimerização (DII) nos resíduos 52–131 e 193–279, que auxilia na fusão da membrana com a partícula viral e atua na dimerização da proteína do envelope, e um domínio semelhante à imunoglobulina (DIII) nos resíduos 296–403, que participa na estabilidade da proteína do envelope e ligação do vírus ao seu receptor na célula hospedeira (Hu *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2022). O DI é formado por uma estrutura β -barril de oito cadeias e forma

uma dobradiça DI/DII conectados por quatro peptídeos. O DII possui uma alça de fusão altamente conservada nos aminoácidos 98–110. Por fim, o DIII possui uma estrutura em formato de barril beta composto por seis fitas beta antiparalelas (Cordero-Rivera *et al.*, 2021). Os estudos de Pindi *et al.* (2021) sugerem que as alças CD e FG do DIII são responsáveis por manter o vírus em uma temperatura estável, além de possuir a capacidade reconhecimento e ligação a anticorpos específicos (Pindi *et al.*, 2021).

Figura 7 – Predição da proteína do Envelope do ZIKV.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0

Modificações como a poliubiquitinação e glicosilação da proteína do envelope, assim como a presença de fatores moleculares, vêm sendo discutidos na associação do vírus a diferentes receptores (Giraldo *et al.*, 2020; Ma; Yuan; Yi, 2022). Há uma região de glicosilação na alça de glicano no domínio I (N154) da proteína, e estudos demonstram que a falta do glicano pode reduzir a patogenicidade do vírus (Hu, *et al.*, 2019). Em mamíferos, a glicosilação neste sítio pode facilitar a infecção em regiões periféricas nos animais ao interagir com o DC-SIGN (Ma *et al.*, 2022). Além disso, a glicosilação do resíduo de asparagina tem ação no reconhecimento da superfície celular pela proteína E (Hu *et al.*, 2021). Do mesmo modo, a ubiquitinação do resíduo

K38 promove uma eficiente ligação e replicação do vírus na célula do hospedeiro pela coexpressão de TRIM7, E2 conjugase (UBCH5A), entre outros (Giraldo *et al.*, 2020).

2.3.5 Entrada Viral

Nos vertebrados, após o atracamento da proteína do envelope aos receptores presentes na membrana da célula hospedeira, ocorre a endocitose mediada por clatrina e o transporte para o compartimento endossomal que permitirá a liberação do genoma viral no citoplasma. Com recrutamento do complexo adaptador AP2, a partícula viral é revestida por clatrina e pode ser endocitada e transportada pela célula, passando pelo processo de maturação na presença do pH ácido durante esse percurso direcionado pelas GTPases (Owczarek *et al.*, 2019). Após o transporte, a camada das vesículas não está mais presente e estas podem se fundir e seguir para os endossomos. Por último, o genoma viral é liberado no citoplasma e traduzido na poliproteína, como ocorre normalmente com os *Flavivirus*. As modificações conformacionais restantes que ocorrem, promovidas pelo pH baixo nos endossomos para a entrada viral, são o favorecimento da mudança de dímeros a trímeros da proteína E depois da ligação das alças de fusão DII na superfície celular (Telehany *et al.*, 2020).

Alguns componentes da saliva dos mosquitos *Aedes sp.* podem interagir com a proteína E do ZIKV e possuir influência na entrada viral. Segundo Valenzuela-Leon *et al.* (2022), foram identificadas três proteínas potenciais que interagem com porção do envelope do ZIKV, a proteína do antígeno 5 (AAEL000793), inibidor do fator Xa (AAEL007420) e Aspyrase (AAEL006347). Outros estudos demonstraram que o inibidor do fator Xa ativa processos de autofagia que podem contribuir para a infecção pelos *Flavivirus* DENV e ZIKV na linhagem celular de leucemia monocítica aguda. Além disso, a Aspyrase tem função de ATPase, além de realizar a conversão de ATP em ADP, e é altamente expressa pelas glândulas salivares dos mosquitos *Aedes aegypti* (Valenzuela-Leon *et al.*, 2022).

2.4 FATORES MOLECULARES E RECEPTORES EM *FLAVIVIRUS*

É de conhecimento que alguns vírus possuem a capacidade de se ligar especificamente a mais de um receptor, assim como as moléculas sintetizadas ou

presentes no meio podem ter importância equivalente na sua interiorização. Para os *Flavivirus*, sua determinação de entrada é complexa e pode ocorrer a partir de múltiplos receptores (Cordero-Rivera *et al.*, 2021). Assim como diversos fatores moleculares foram sugeridos para diferentes *Flavivirus* como importantes para a ligação do vírus na célula do hospedeiro e na entrada viral. Algumas moléculas utilizadas são os receptores de lectinas DC-SIGN (DENV, JEV, WNV), receptores de fosfatidilserina das famílias TIM e TAM, glicosaminoglicanos (DENV, JEV, WNV, YFV), *Claudin-1* (DENV, WNV) e proteínas do choque térmico (DENV, JEV, ZIKV) como interação inicial com a superfície celular e atracamento do vírus (Anwar *et al.*, 2022).

Os receptores de lectina do tipo C são proteínas transmembranares que promovem a ligação dos *Flavivirus* ao utilizar os carboidratos presentes na estrutura da proteína E e M, dentre os ligantes desses receptores é válido ressaltar o DC-SIGN. DC-SIGN são proteínas capazes de se ligar a diversos tipos de patógenos, e, a partir desse contato, vírus como o ZIKV são capazes de ultrapassar a barreira imune das células dendríticas e realizar a replicação nesse sítio, causando disfunções na resposta imune adaptativa e conseqüentemente o aumento da patogênese (Menechino *et al.*, 2023). Os experimentos de interação molecular realizados por Menechino *et al.* (2023) identificaram uma maior interação do ZIKV com o DC-SIGN no domínio de reconhecimento de carboidratos do que DENV. Além disso, para o vírus da dengue, vários estudos de determinação da sua estrutura por microscopia crioeletrônica revelam que a infecção mediada pelas proteínas DC-SIGN é dependente da glicosilação no sítio dos resíduos de aminoácidos asparagina. Foram identificados duas regiões de glicosilação da proteína E no DENV, Asn67 e Asn153, sendo essa última presente também em outros *Flavivirus* (Anwar *et al.*, 2022).

Outro receptor amplamente utilizado por vírus envelopados para favorecer a endocitose são os receptores de fosfatidilserina, que podem ter papel atuante a partir da ubiquitinação. Os estudos revelam que a expressão da família TIM-1 e TIM-4 dependentes dos receptores de fosfatidilserina aumentam a infecção viral nos *Flavivirus*, especificamente nos vírus DENV, JEV, WNV e ZIKV. Através da ubiquitinação dos aminoácidos de lisina intracelulares, pode ser co-internalizada a partícula viral juntamente com o receptor do hospedeiro, fosforilando o TIM durante o processo de endocitose, e desencadeando a ativação da via da serina-treonina quinase e do PI3K. De mesmo modo, a família TAM, composta pelos membros TYRO-

3, AXL e MERTK também pode ter sua porção intracelular fosforilada. A conversão do PI3K no alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma proteína quinase, modifica o objetivo de entrada viral para a regulação do metabolismo e pode influenciar a viabilidade do ZIKV, assim como estudos demonstraram que a ativação do mTOR está associada a persistência do vírus em macacos da espécie *Rhesus* (Oliveira; Peron, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar potenciais fatores moleculares associados ao ciclo de infecção do ZIKV em linhagens de células de inseto a partir de ensaios de ligação proteína-proteína, espectrometria de massas e análises *in silico*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar possíveis parceiros proteicos *in vitro* da proteína recombinante do envelope (E) do ZIKV com proteínas de diferentes preparações proteicas de linhagens celulares de inseto C6/36 e Sf9 através de ensaios de ligação do tipo *pull-down*;

2- Identificar proteínas ligantes candidatas associadas à infecção do ZIKV nas linhagens celulares de inseto através de espectrometria de massas e análises *in silico*;

3- Analisar comparativamente se as proteínas de interesse resultantes são similares ou não a proteínas de ligação já descritas para outros *Flavivírus* como o vírus Dengue, Encefalite Japonesa e o Oeste do Nilo;

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS E VÍRUS

As linhagens celulares utilizadas neste estudo são: a C6/36 (CRL-1660; ATCC) suscetível a infecção pelo ZIKV e comumente utilizada para propagação viral em laboratório, e a Sf9 (CRL-1711; ATCC), não suscetível e não permissível à infecção por Flavivírus e comumente utilizada em nosso laboratório para expressão heteróloga de proteínas recombinantes. A linhagem Sf9 é oriunda de tecido ovariano de pupa de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e suscetível apenas à infecção pelo Flavivírus da Encefalite japonesa (JEV) (Geisler; Jarvis, 2018). As células C6/36, oriundas de macerados totais de larvas de *Aedes albopictus* foram cultivadas em meio de crescimento Leibowitz (L-15) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 2-5% (Gibco®), TBP-pó (*Tryptose Fosfate Broth*), L- Glutamina, aminoácidos não-essenciais, penicilina e estreptomicina (Gibco®). Os cultivos de células Sf9 foram realizados em sistema de monocamada aderente em frascos de cultura contendo meio Sf900 (Gibco®) e suplementado com os antibióticos segundo recomendações do fabricante. O repique celular foi realizado em fase de confluência segundo o manual *Insect Cell Lines: Growth and Maintenance of Insect Cell Lines® (Invitrogen)*. Os cultivos foram mantidos em estufa a 28°C e analisados diariamente pelo microscópio quanto a sua morfologia.

4.2 PREPARAÇÕES DE EXTRATOS PROTEICOS DE LINHAGENS CELULARES C6/36 E SF9

A obtenção dos extratos proteicos citosólicos e de membrana das linhagens celulares de inseto C6/36 e Sf9 ocorreu através da utilização do Kit de extração de proteínas de membrana de células e tecidos *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific)*, conforme as instruções do fabricante. A preparação dos extratos foi realizada em triplicata. Ao final do processo, os extratos proteicos foram armazenados imediatamente a -80°C até sua utilização em ensaios de ligação proteína-proteína. Uma fração desses extratos foi eluída em *Laemmli 2X* e desnaturada a 100°C por 5 minutos para checagem de potencial degradação da amostra por eletroforese de proteínas. As amostras foram analisadas por migração eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10%

a fim de verificar a qualidade das bandas proteicas coradas com azul de coomassie. Além disso, os extratos proteicos também foram quantificados por espectrofotometria de luz UV-visível NanoDrop™ 2000 (*Thermo Fisher Scientific*) utilizando o método de quantificação direta através do comprimento de onda de 280nm.

4.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA E (PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKV) RECOMBINANTE

As preparações de cDNA que codificam a proteína E do ZIKV já foram realizadas pelo grupo de pesquisa do departamento de Entomologia do IAM através de reações de transcrição reversa (RT-PCR) e conforme as recomendações do Kit AMVCloned (Invitrogen®) a partir de RNA total de ZIKV PE243 cedido cordialmente pelo departamento de Virologia Experimental - LAVITE. Os primers desenhados para amplificar o cDNA que codifica a proteína E permitiram a clonagem da sequência do envelope em diferentes vetores de expressão pET21a- Novagem®, pGEX-4T-3 (Amersham) e algumas pequenas modificações foram inseridas a fim de otimizar sua produção em sistema de expressão procarioto. A produção e purificação da respectiva proteína E em *E. coli* foi realizada com sucesso e com eficiente produção da proteína E recombinante fusionada a GST (ENV-GST). Para esse estudo, a proteína ENV-GST foi dialisada e quantificada e utilizada nos ensaios de ligação do tipo *pull-down*. Ensaios de *western-blotting* foram realizados utilizando o anticorpo comercial 4G2 “*Mouse Anti-Flavivirus Envelope Protein Antibody 4G2*” (Native Antigen) para revelar a específica imunodeteção da proteína E recombinante produzida.

4.4 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO TIPO *PULL-DOWN* PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES

Os ensaios de ligação do tipo *pull-down* tem como objetivo identificar a ocorrência da interação entre a proteína do envelope viral recombinante (ENV-GST), imobilizada em resina de glutationa sefarose, e as proteínas presentes nos extratos proteicos das linhagens de células C6/36 e Sf9. Se houver interação específica, a proteína co-precipitada com a resina, pode ser dissociada por tampão desnaturante e fervura, seguida de avaliação por SDS-PAGE corado com azul de coomassie® *brilliant blue G 250*. Para este ensaio, foi adicionado 300 µL da resina glutationa sefarose em um falcon, lavada com tampão específico BB3 (100mM de KCl 3M, 1mM de MgCl₂ 1M, 50mM de HEPES 1M, IGEPAL CA-630 0,2%, glicerol 5%, H₂O q.s.p. para volume

final de 250mL, pH 7,5) e centrifugada a 4000rpm, 4°C por 2 minutos. Completou-se com tampão BB3 para atingir o volume final de 600 µL e foi adicionado 600µL de tampão BSA/BB3 para evitar ligações inespecíficas através do bloqueio com BSA de potenciais sítios ativos descobertos na resina, a incubação ocorreu por 1 hora a 4°C sob agitação constante. Após sucessivas lavagens, o volume foi fracionado igualmente nos tubos para cada proteína a ser imobilizada e o ensaio posterior foi conduzido em duplicata. Em cada tubo, o conjunto Resina/BSA foi incubado com 3 µg das proteínas de interesse a serem imobilizadas durante 1 hora, 4°C sob agitação constante. Foram utilizados quatro tubos para controle negativo contendo: Resina/BSA, Resina/BSA/ENV-GST sem incubação com extrato, Resina/BSA/GST incubada com extrato proteico de C6/36, Resina/BSA/GST incubada com extrato proteico de Sf9. Os tubos dos experimentos testes também têm o mesmo quantitativo de resina, sendo dois grupos realizados com Resina/BSA/ENV-GST incubadas com os extratos proteicos de membranas obtidos em duplicata para cada linhagem celular. Ao fim do procedimento, as amostras foram eluídas com *Laemmli 2X* e avaliadas em gel SDS-PAGE a 10%, coradas com azul de coomassie. Além disso, as amostras também foram transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas utilizando o anticorpo comercial anti-envelope 4G2 que reconhece os epítomos presentes na proteína do envelope dos *Flavivírus*. Os *spots* correspondentes às proteínas ligantes do ZIKV foram manualmente excisados a partir dos géis unidimensionais de SDS-PAGE 10%. O processo consistiu em migrar as amostras em gel de poliacrilamida até o conteúdo sair da fase de empacotamento (*stacking*), assim, concentrando as amostras em banda única, permitindo a excisão com bisturi de fibra cirúrgica. Posteriormente, as amostras foram processadas para sua identificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas no sistema LTQ Orbitrap XL ETD da Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (ICC). Os grupos experimentais selecionados para a identificação por espectrometria de massas foram Resina/BSA/ENV-GST e Resina/BSA/GST incubadas com extratos protéicos de cada uma das células, C6/36 e Sf9, realizados em duplicata para cada ensaio.

4.4.1 Filtragem e Normalização

As proteínas ligantes resultantes da análise por espectrometria de massas

foram caracterizadas de acordo com os parâmetros do equipamento e expostas em tabelas, onde foi possível identificar, filtrar e normalizar os dados com base numa análise comparativa das proteínas evidenciadas no teste com maior intensidade em relação ao controle. A análise inicial consistiu em obter informações sobre os ligantes através do alinhamento das proteínas totais comparadas aos bancos de dados do *Protein Data Bank* e proteomas das espécies *Aedes albopictus* e *Spodoptera Frugiperda*, obtidos pelo NCBI, e com conteúdo disponibilizado no UniProt. As proteínas totais foram reduzidas apenas aos ligantes selecionados e obteve-se o fator de normalização a partir da soma de todas as intensidades, seguida da divisão pelo maior numerador. Depois, essa intensidade para amostra foi substituída pela coluna de intensidade normalizada obtida pela multiplicação das linhas pelo fator de normalização. Para avaliar a intensidade dos controles e das amostras entre si foram calculadas a média das réplicas e a razão da intensidade das amostras presentes sobre a intensidade das amostras controles, proteína do envelope fusionada a GST e proteína GST. Após esse passo, foi realizada a filtragem com exclusão dos ligantes que continham contaminantes na linha referente a coluna de identificação das proteínas e razões com valores inferiores a 1.5. Além disso, a seleção dos ligantes candidatos passou pela avaliação dos peptídeos únicos identificados, excluiu-se as proteínas que estavam presentes apenas na amostra controle e não nos grupos testes. Após a filtragem dos candidatos a ligantes da proteína E, foram selecionadas as proteínas qualificadas que atenderam aos critérios propostos para realizar a análise *in silico*.

4.5 ANÁLISES *IN SILICO*

A análise *in silico* pelo método de *docking* molecular utilizou com prioridade as proteínas com informações na literatura e maior intensidade para realizar a avaliação da interação entre os ligantes e a proteína E do ZIKV. O *docking* molecular consiste na simulação de interação entre um receptor de uma proteína e um ligante, a simulação é realizada em diferentes posições dos ligantes e tem como resultado um *ranking* das melhores afinidades pelos *scores* que levam em consideração funções eletrostáticas, modelos de solubilidade e métodos de mecânica quântica (Fan; Fu; Zhang, 2018; Li; Fu; Zhang, 2019). A determinação da ligação das proteínas é avaliada pela mudança na energia livre, que define a estabilidade da estrutura e a

formação de complexos de proteína-proteína (Siebenmorgen; Zacharias, 2019; Patel, D., Patel, J.; Ytreberg, 2021). O controle positivo utilizado para avaliar a energia livre do *docking* molecular foi a estrutura cristalográfica de DC-SIGN complexada a manose, obtida do banco de dados do RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Primeiramente, foi obtida a predição da estrutura terciária das proteínas de interesse a partir da sequência de aminoácidos pelo banco de dados da ferramenta desenvolvida pela DeepMind baseada em aprendizagem de máquina, o *AlphaFold2* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). As estruturas preditas foram validadas pela estereoquímica através do gráfico de Ramachandran que avalia o ângulo de torção dos aminoácidos pelo MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). As melhores estruturas preditas de acordo com a validação seguiram para a análise de *docking* molecular do tipo proteína-proteína (Yan *et al.*, 2020), utilizando a ferramenta online HDock Server (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>). Ao final do processo, para cada linhagem celular, foram avaliados os modelos de proteínas com a menor energia livre de ligação com visualização das regiões de interação utilizando a ferramenta *PyMOL* 3.0 (<https://www.pymol.org>).

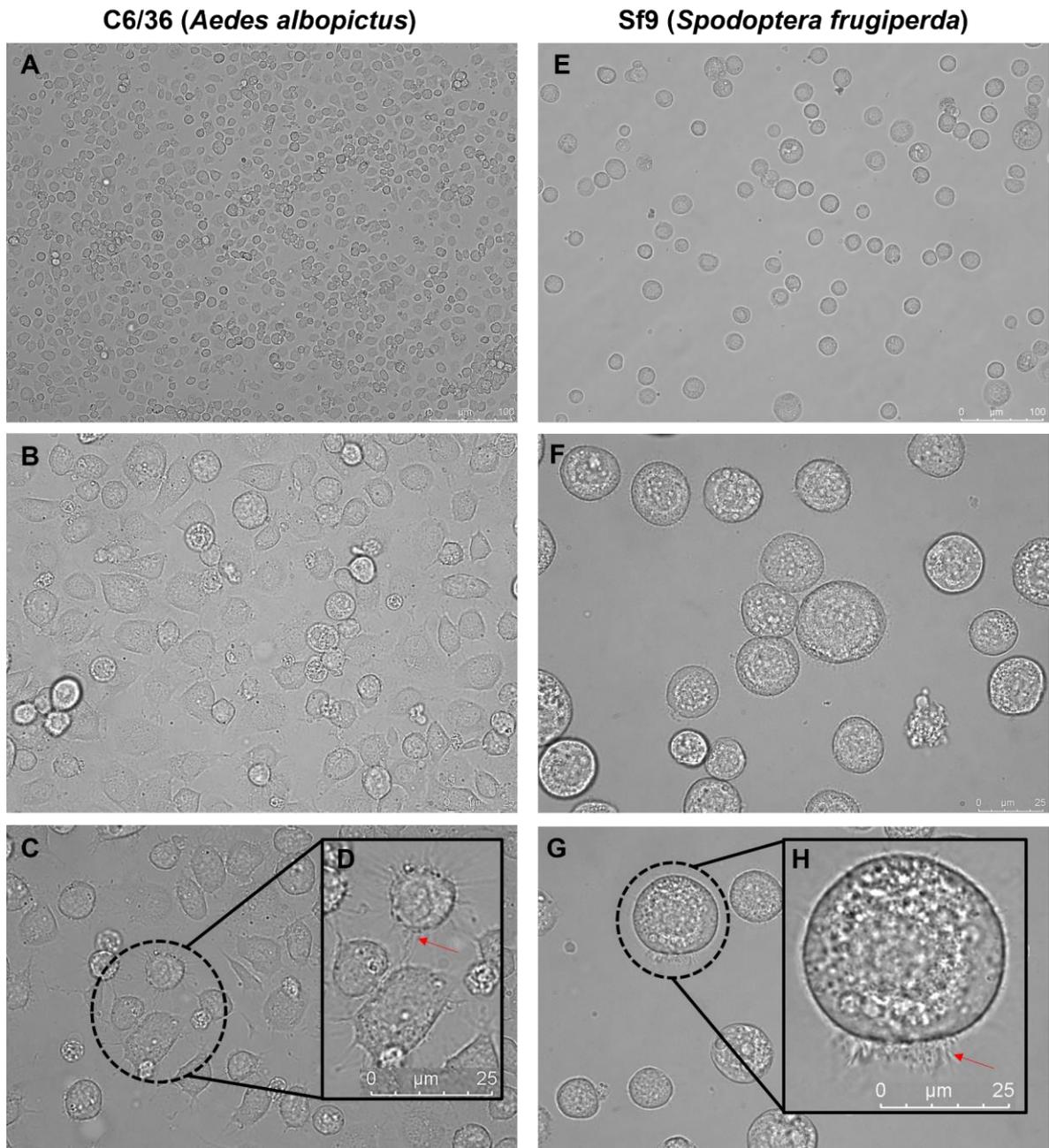
5 RESULTADOS

5.1 CULTURA DE CÉLULAS

A cultura 2D das células C6/36 oriundas de *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660) foi estabelecida em 1967 a partir de macerados totais de larvas recém eclodidas de ancestralidade não especificada (Singh *et al.*, 1967). De fácil manutenção e propagação, esta linhagem tem um rápido crescimento com adição de soro fetal bovino (SFB) e possui diversas aplicações na pesquisa, como no diagnóstico, isolamento e propagação de vírus em laboratório devido a ampla suscetibilidade e permissibilidade à infecção por vários arbovírus, em especial, os *Flavivírus* (Walker *et al.*, 2014). Durante o cultivo, sua morfologia se mostrou irregular com inúmeras projeções citoplasmáticas mediadas por filopódios (Figura 8 C-D). À medida que as células se multiplicam, próximas à confluência, exibe uma morfologia mais arredondada e uniforme.

Já a linhagem Sf9 foi inicialmente isolada a partir de um clone da linhagem celular Sf21 (IPLB-Sf-21-AE), derivada do tecido ovariano de pupa do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf) (Vaughn *et al.*, 1977). Morfologicamente, a Sf9 exibe uma característica mais uniforme e esférica como mostrado na Figura 8 (E-F) logo após o repique celular. Sua membrana plasmática permanece regular durante todo o ciclo do cultivo, exibindo pequenas e numerosas projeções filopodiais (Figura 8 G-H). A manutenção requer aproximadamente sete dias para o estágio de confluência, sendo necessário a troca do meio de cultivo a cada 48 horas.

Figura 8 – Microscopia óptica de luz invertida dos cultivos celulares.



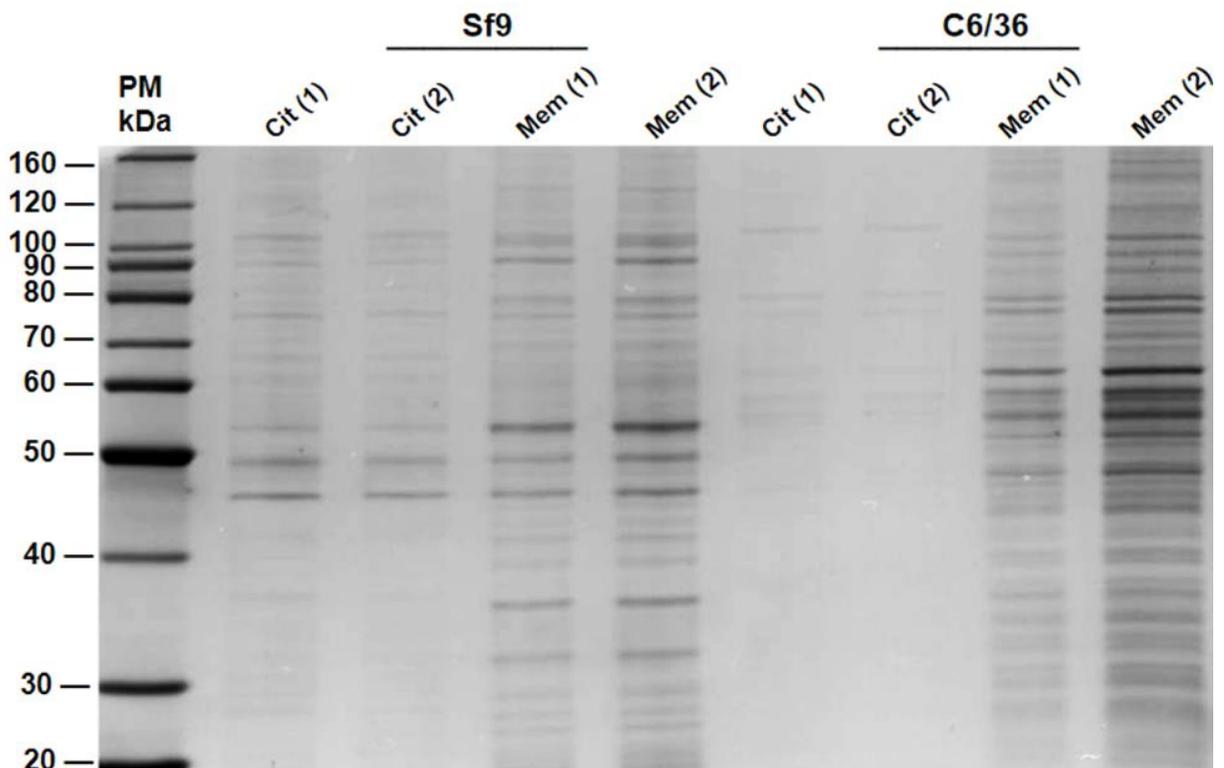
Fonte: Própria do autor.

Legenda: Cultura de células C6/36 e Sf9 vistas por microscopia óptica de luz invertida após repique celular. (A) C6/36 100 μm , (B) C6/36 25 μm , (C e D) C6/36, seta vermelha indicando projeções citoplasmáticas filopodiais, barra de escala de 25 μm . (E) Sf9 100 μm , (F) Sf9 25 μm , (G e H) Sf9, seta vermelha indicando os filopódios menos proeminentes quando comparado com a C6/36, barra de escala de 25 μm . Imagens obtidas pelo microscópio invertido Leica DMI8 utilizando o campo claro.

5.2 PREPARAÇÕES DE EXTRATOS PROTEICOS DE LINHAGENS CELULARES C6/36 E SF9

Para dar início ao ensaio de ligação com a proteína E do ZIKV, as proteínas membranares e citosólicas foram obtidas das células C6/36 e Sf9 em fase de confluência pelo *Kit Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific)*. As amostras das proteínas citosólicas e de membrana foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente. A análise qualitativa dos perfis das bandas proteicas foi realizada por migração eletroforética em gel SDS-PAGE 10% (Figura 9). As concentrações das proteínas extraídas foram estimadas pelo método de quantificação direta através do comprimento de onda de 280nm no equipamento NanoDrop 2000™ (*Thermo Fisher Scientific*), utilizando 2 μ L das amostras obtidas (Tabela 1). A concentração das amostras de membrana de C6/36 foi de 0,247 μ g/ μ L e para as células da Sf9 o valor foi de 0,137 μ g/ μ L. Foi possível observar um perfil de bandas conservado sem degradação em ambas as amostras.

Figura 9 – Avaliação do perfil de bandas proteicas (membrana e citosol) por SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie.



Fonte: Própria do autor.

Legenda: Legenda: SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie, volume de 10 μ L aplicado no gel. PM: Peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder - Thermo Fisher Scientific*; kDa: kilodalton. Cit (1): amostras citosólicas da primeira extração. Cit (2): amostras citosólicas da segunda extração.

Mem (1): amostras de membrana da primeira extração. Mem (2): amostras de membrana da segunda extração. Os traços indicam os pesos moleculares esperados.

Tabela 1 – Quantificação das amostras de proteínas pelo NanoDrop, método A280.

ID	Concentração	Protein $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Membrana C6/36 P93	0,495	0,247
Membrana Sf9 P8	0,2755	0,137

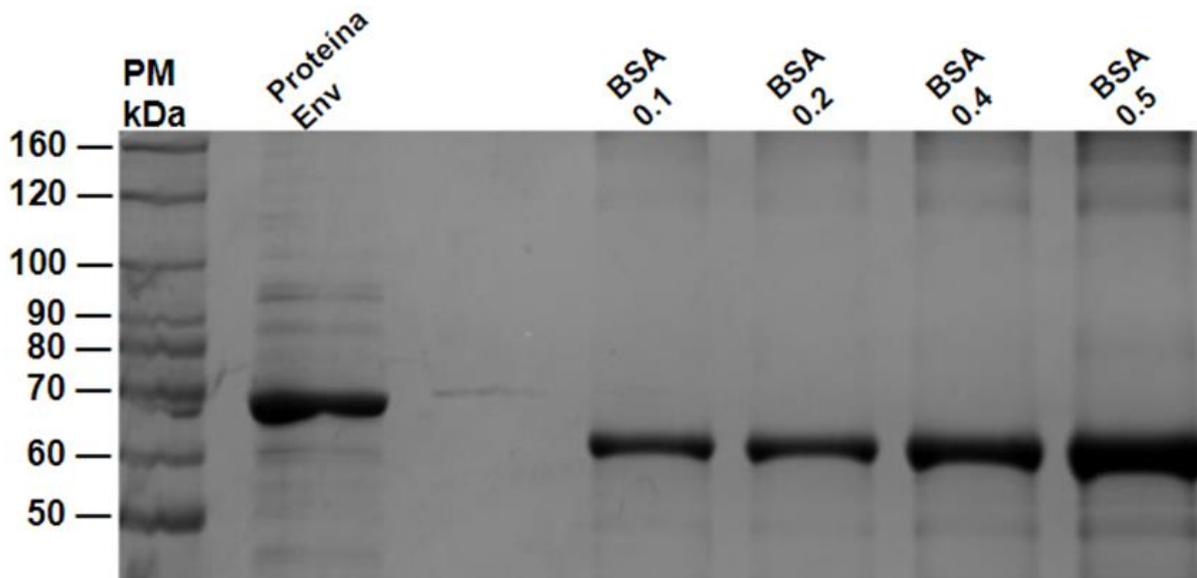
Fonte: Própria do autor.

Legenda: ID: Identificação das amostras. P: refere-se à passagem das linhagens celulares. Volume aplicado para quantificação foi de 2 μl .

5.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA E (PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKV) RECOMBINANTE

A quantificação da proteína do envelope recombinante (ENV-GST) para realização do ensaio de *pull-down* foi realizada a partir da análise da curva padrão formada pela diluição seriada da albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 0.1, 0.2, 0.4 e 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, e mensurada no equipamento *iBright Imaging Systems* (*Thermo Fisher Scientific*) (Figura 11).

Figura 10 – Gel SDS-PAGE 10% da quantificação da proteína do envelope pela curva de diluição seriada do BSA.



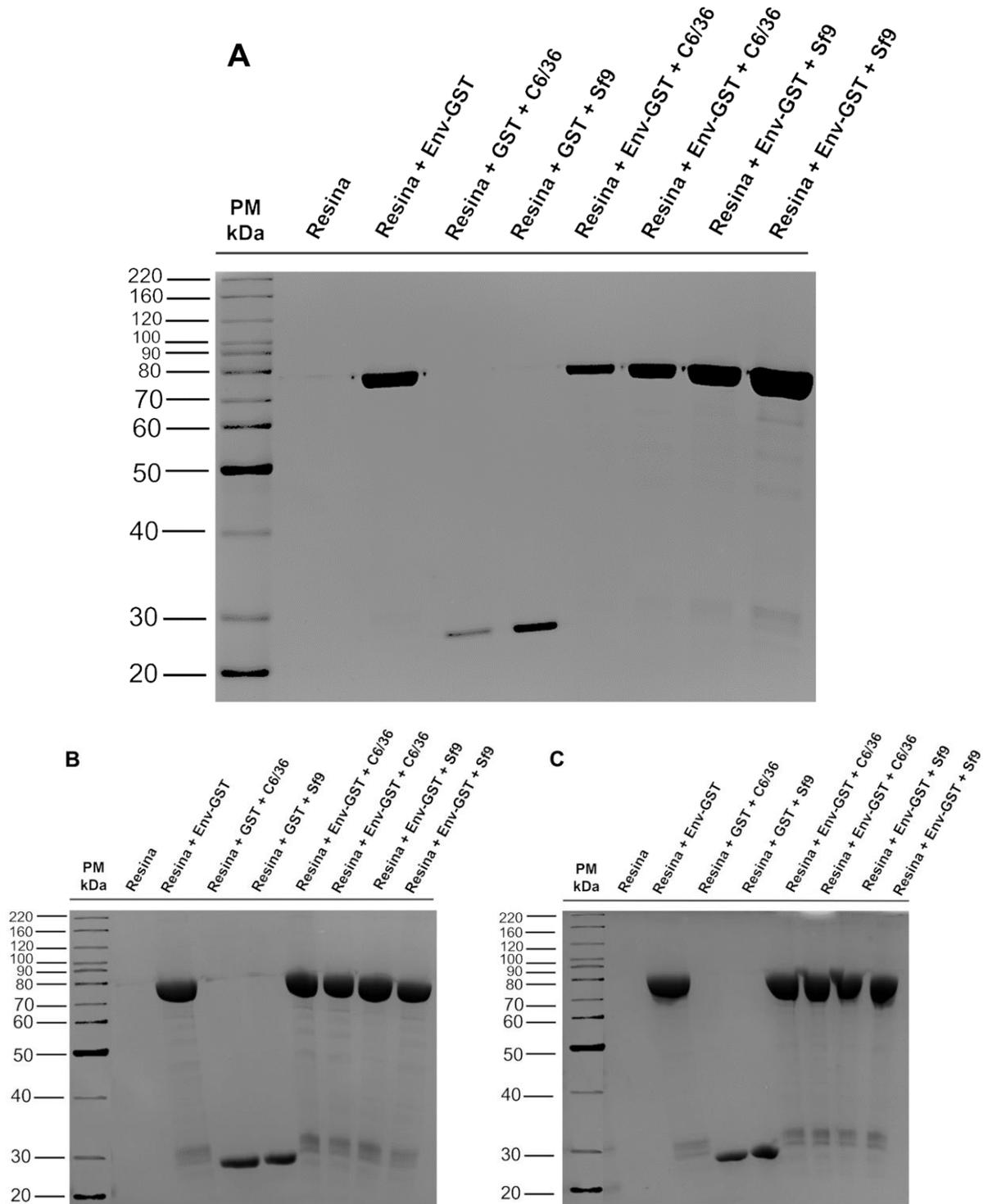
Fonte: Própria do autor.

Legenda: SDS-PAGE 10% da quantificação da proteína ENV-GST por BSA. PM: Peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder - Thermo Fisher Scientific*; kDa: kilodalton. Proteína Env: proteína do envelope recombinante fusionada a GST. BSA: albumina de soro bovino. Os traços indicam os pesos moleculares esperados.

5.4 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DO TIPO PULL-DOWN PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES

O ensaio de *Pull-down* foi avaliado qualitativamente através de SDS-PAGE 10%. Esta avaliação revelou a captura de proteínas presentes no extrato proteico das células estudadas. As proteínas coprecipitadas de C6/36 e Sf9 que apareceram nos grupos testes variaram de ~20 a ~80 kDa e estas interagiram com a proteína ENV-GST (~77 kDa) ligada à resina de glutationa sepharose, demonstrando interação específica e persistente mesmo após as lavagens (Figura 11). Para os controles negativos, utilizamos a resina/BSA sem incubação com extratos proteicos, resina/Env-GST sem incubação com extratos proteicos, resina/ GST com incubação com os extratos de C6/36 e de Sf9, respectivamente. A utilização da proteína GST, através do controle resina/GST incubado com os extratos proteicos das células, teve por objetivo avaliar possíveis sinais de ligações inespecíficas das proteínas presentes nos extratos com a GST na reação. No gel, observa-se apenas a banda da proteína GST em torno de ~30 kDa, indicando que não houve nenhuma interação das proteínas de membrana das células com a proteína GST. Desta forma, confirmamos que não houve interações inespecíficas com a GST fusionada à proteína do envelope recombinante. Assim como no grupo só resina e resina/ENV-GST.

Figura 11 – Gel de SDS-PAGE 10% do ensaio de *pull-down*.

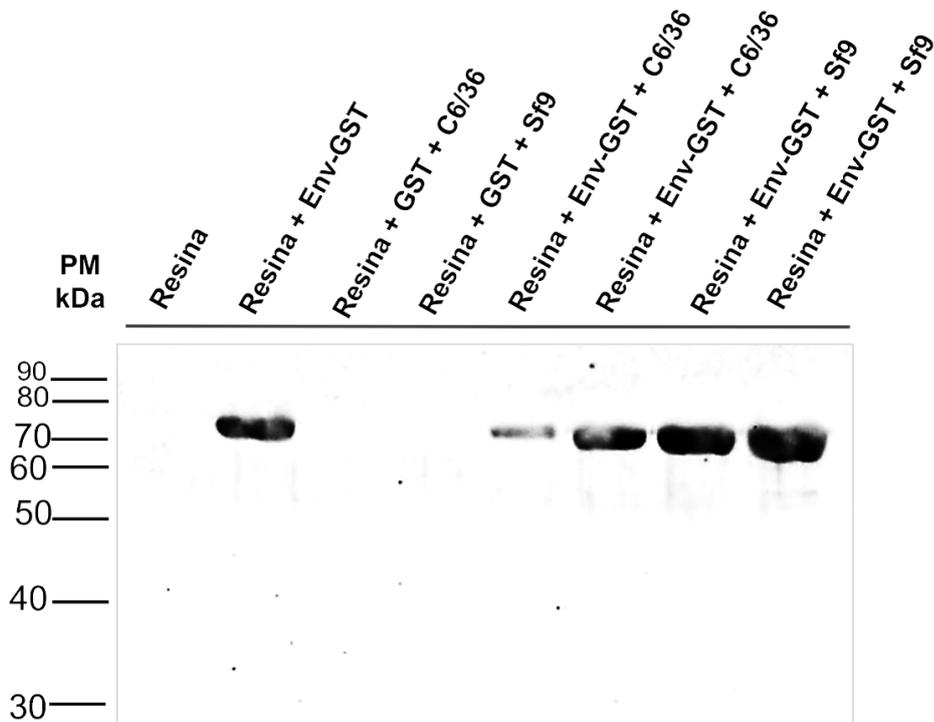


Fonte: Própria do autor.

Legenda: SDS-PAGE 10% do ensaio de *Pull-down* corado com azul de coomassie. (A) Primeira réplica, (B) Segunda réplica, (C) Terceira réplica. PM: Peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder - Thermo Fisher Scientific*; kDa: kilodalton. Resina: resina de glutationa sefarose. ENV-GST: proteína do envelope recombinante fusionada a GST. GST: proteína glutationa S-transferase. Os traços indicam os pesos moleculares esperados.

A imunodetecc o com o anticorpo anti-envelope *mouse* 4G2 (1:5000) do ensaio de *pull-down*, confirmou a presena específica da proteína do envelope ENV-GST presente nos grupos nos quais ela foi incubada (Figura 13). Uma nova migrao eletroforética foi realizada com as amostras do *pull-down* e seus respectivos controles (extratos proteicos incubados com GST e proteína ENV em resina de glutationa sefarose). Os spots correspondentes às proteínas ligantes foram manualmente excisados em géis unidimensionais de SDS-PAGE 10%. As amostras cortadas foram armazenadas com 500 L de água deionizada ultrapura e encaminhada para a análise por espectrometria de massas no núcleo de plataformas de prote mica de Espectrometria de Massa do Instituto Carlos Chagas (ICC), FIOCRUZ-PR. Nesse local, as amostras são processadas e submetidas à etapas de tripsinizao, e seus polipeptídeos fragmentados passam pela análise por cromatografia líquida de espectrometria de massas (LC-MS/MS) no aparelho *Thermo Scientific Easy-nLC 1000 Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) acoplado ao espectr metro LTQ-Orbitrap XL ETD (*Thermo Fisher Scientific*).

Figura 12 – Western Blotting do ensaio de *pull-down*.



- Anticorpo anti-envelope mouse 4G2 (1:5000)
- Proteína Env-GST possui 77 kDa.

Fonte: Própria do autor.

Legenda: *Western blotting* do ensaio de *pull-down* para imunodeteção da proteína ENV-GST de 77 kDa. PM: Peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder - Thermo Fisher Scientific*; kDa: kilodalton. Resina: resina de glutationa sefarose. ENV-GST: proteína do envelope recombinante fusionada a GST. GST: proteína glutationa S-transferase. Os traços indicam os pesos moleculares esperados.

A análise por espectrometria de massas identificou 165 proteínas ligantes totais. Após filtragem, o número dos ligantes candidatos foram de 9 proteínas para C636 (Tabela 2) e 15 para *Sf9* (Tabela 3), com duas proteínas em comum para ambas as linhagens celulares. Para as proteínas identificadas em *Aedes albopictus*, a *ADP/ATP translocase* (A0A182H5B9) foi descrita como influenciadora da patogênese viral em vertebrados. A *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* (A0A182HB17) é uma proteína do choque térmico de peso molecular intermediário, e essas proteínas são comumente expressas mediante estresse celular, podendo estar envolvidas na infecção viral. Além disso, as proteínas não caracterizadas, do inglês *Uncharacterized proteins* (A0A182G4X7), não possuem reconhecimento de domínio e função, sendo potenciais candidatas para investigação no ciclo de infecção dos arbovírus. Em *Spodoptera frugiperda*, devem ser levadas em consideração também as proteínas não caracterizadas e os ligantes *ADP/ATP translocase* (A0A2H1WC32), *Glutathione transferase* (A0A9R0DLW5), *Glutathione S-transferase 1* (A0A2H1WG82), *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* (A0A5Q0TYX6), *Prostaglandin reductase* (A0A9R0EHA4) e *Tubulin alpha chain* (A0A2H1WFF5). A identificação dos ligantes nas diferentes linhagens celulares reconheceram as proteínas *ADP/ATP translocase* e *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* tanto para a C6/36 quanto para a *Sf9*.

Tabela 2 – Proteínas ligantes candidatas de *Aedes albopictus* selecionadas após filtragem.

Nº	ID InterPro	Função	Peso Molecular	P. Únicos
1	A0A182H826	FK506-binding protein	42.648	1
2	A0A182GG09	Uncharacterized protein	23.712	2
3	A0A023ER38	Putative 60s ribosomal protein I23	39.447	2
4	A0A023ERU9	Putative ribosomal protein I3	46.811	1

5	A0A182H5B9	ADP/ATP translocase	72.414	1
6	A0A182G3C0	Uncharacterized protein	67.226	2
7	A0A182G4X7	Uncharacterized protein	102.800	1
8	A0A182H3D8	Arginine-tRNA ligase	75.582	1
		<i>Heat shock 70 kDa protein</i>		
9	A0A182HB17	<i>cognate 5</i>	73.943	2

Fonte: Própria do autor.

Legenda: Nº: Número das proteínas ligantes, Peso molecular: Peso molecular em kDa, P. únicos: Peptídeos únicos identificados na espectrometria de massas.

Tabela 3 – Proteínas ligantes candidatas de *Spodoptera frugiperda* selecionadas após filtragem.

Nº	ID InterPro	Função	Peso Molecular	P. Únicos
1	A0A2H1WC32	ADP/ATP translocase	32.88	2
2	A0A2H1V5B6	Large ribosomal subunit protein eL6	30,596	2
3	A0A9R0DY22	Uncharacterized protein	712.07	1
4	Q962S9	Large ribosomal subunit protein eL33	17,393	1
5	A0A0K2CTV1	Ribosomal protein L23A	31,095	1
6	A0A9R0DHV2	Late histone H1-like	24,526	1
7	A0A2H1VYR2	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	68,646	1
8	A0A9R0D1L6	Leucine-rich repeat-containing protein 23-like isoform X2	33,404	1
9	A0A9R0EG14	Nose resistant to fluoxetine	78,858	1

<i>protein 6</i>				
10	A0A9R0D543	<i>Uncharacterized protein</i>	93,942	1
11	A0A9R0DLW5	<i>Glutathione transferase</i>	46,753	2
12	A0A2H1WG82	<i>Glutathione S-transferase 1 (Fragment)</i>	24,432	2
13	A0A9R0EHA4	<i>Prostaglandin reductase</i>	36,455	1
14	A0A2H1WFF5	<i>Tubulin alpha chain</i>	49,819	1
15	A0A5Q0TYX6	<i>Heat shock 70 kDa protein cognate 5</i>	74,839	2

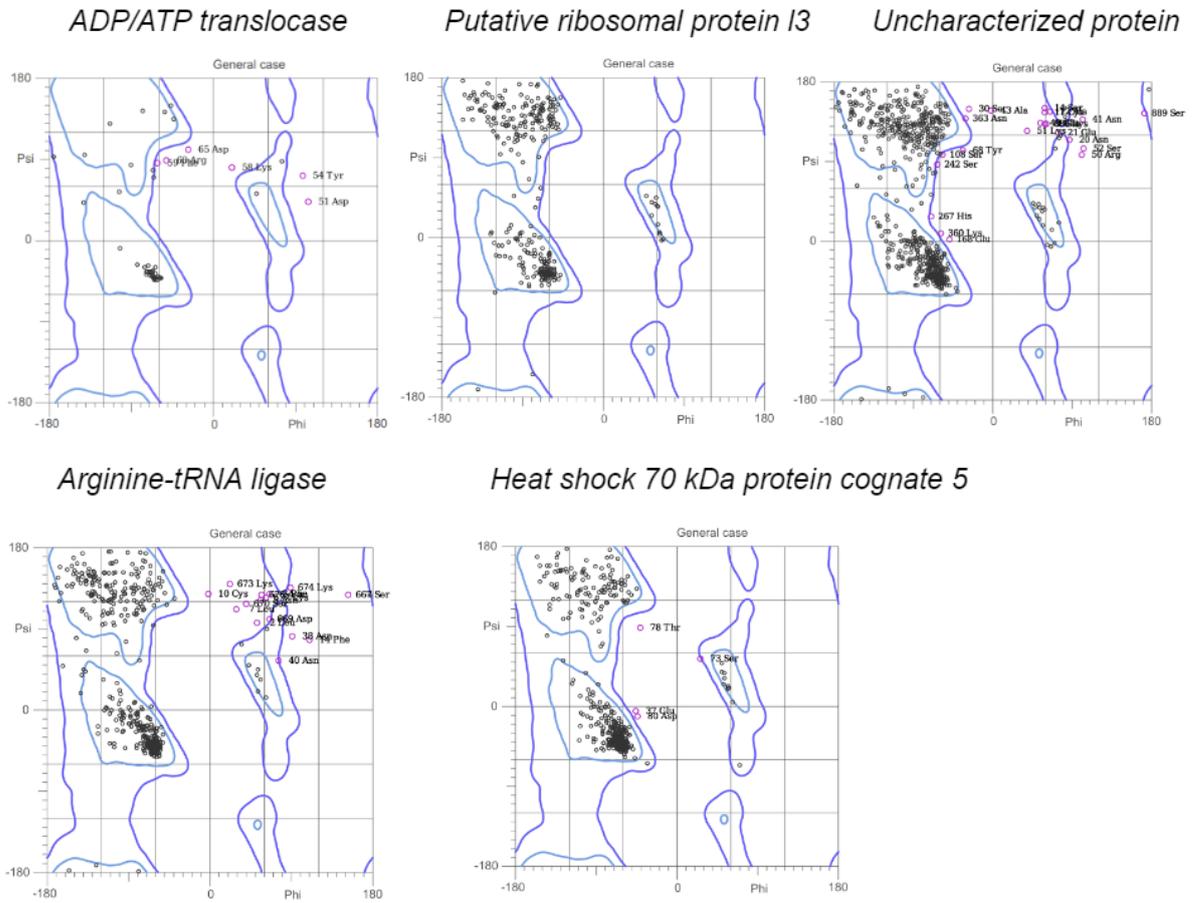
Fonte: Própria do autor.

Legenda: Nº: Número das proteínas ligantes, Peso molecular: Peso molecular em kDa, P. únicos: Peptídeos únicos identificados na espectrometria de massas.

5.5 ANÁLISES *IN SILICO*

A estrutura terciária das proteínas preditas pelo *AlphaFold2* foi validada pelo gráfico de Ramachandran, e as melhores estruturas seguiram para a análise com a ferramenta de *docking* molecular para visualização da interação dos ligantes candidatos com a proteína E do ZIKV. O valor delimitado para a validação da estrutura pelo gráfico de Ramachandran utilizando a ferramenta MolProbity foi de pelo menos 90% ou acima de resíduos em regiões favoráveis e acima de 96% para resíduos em regiões permitidas. O único modelo que não atendeu aos critérios e que teve continuidade para realização do *docking* foi a *ADP/ATP translocase* de C6/36 a fim de realizar a comparação com o *docking* da Sf9. O gráfico de Ramachandran está exposto para *Aedes albopictus* (Figura 14) e *Spodoptera frugiperda* (Figura 15) com as estruturas preditas que atendem aos critérios.

Figura 13 – Plot de Ramachandran para as estruturas preditas das proteínas candidatas a ligantes em C6/36 (*Aedes albopictus*).



Fonte: Própria do autor.

Legenda: Gráfico de Ramachandran exibindo as regiões permitidas e regiões favoráveis para os ângulos de torção phi e psi. Os resíduos de aminoácidos estão representados por pontos preto no gráfico, e suas localizações indicam possíveis conformações de estruturas secundárias, como α -hélices e folhas β .

de *Aedes albopictus* e *ADP/ATP translocase*, *Glutathione transferase*, *Glutathione S-transferase 1*, *Glucose dehydrogenase*, *Heat shock 70 kDa protein cognate 5*, *Prostaglandin reductase* e *Tubulin alpha chain* de *Spodoptera frugiperda*. Para cada *docking*, foram selecionados os 10 primeiros modelos de interação proteína-proteína, que foram salvos e analisados quanto ao valor de menor energia livre. A energia livre dos 10 modelos produzidos para o controle positivo DC-SIGN foi de 1º = -290,05; 2º = -266,65, 3º = -264,29; 4º = -261,45; 5º = -256,84; 6º = -255,15; 7º = -252,53; 8º = -244,28; 9º = -243,16; 10º = -243,01. O *ranking* dos modelos estão expostos em tabelas para C6/36 (Tabela 4) e Sf9 (Tabela 5), organizados de forma crescente para cada ligante.

Tabela 4 – Ranking de energia livre dos modelos produzidos no *docking* molecular com os ligantes candidatos de C6/36, *Aedes albopictus*, selecionados após filtragem.

Ligantes	Energia livre dos modelos
<i>ADP/ATP translocase</i>	1º = -275,50; 2º = -273,09; 3º = -259,70; 4º = -257,82; 5º = -255,85; 6º = -253,66; 7º = -249,32; 8º = -247,45; 9º = -247,31; 10º = -246,61
<i>Putative ribosomal protein I3</i>	1º = -302,83; 2º = -292,29; 3º = -291,14; 4º = -288,01; 5º = -280,62; 6º = -277,61; 7º = -274,84; 8º = -267,20; 9º = -265,37; 10º = -264,64
<i>Uncharacterized protein</i>	1º = -284,37; 2º = -283,91; 3º = -281,51; 4º = -275,31; 5º = -261,96; 6º = -256,11; 7º = -253,69; 8º = -247,00; 9º = -236,46; 10º = -233,58
<i>Arginine--tRNA ligase</i>	1º = -244,72; 2º = -231,73; 3º = -217,60; 4º = -217,05; 5º = -215,71; 6º = -214,52; 7º = -210,96; 8º = -210,03; 9º = -208,52; 10º = -207,00
<i>Heat shock 70 kDa protein cognate 5</i>	1º = -240,33; 2º = -236,82; 3º = -224,45; 4º = -221,72; 5º = -218,02; 6º = -212,63; 7º = -211,33; 8º = -207,32; 9º = -205,61; 10º = -204,91

Fonte: Própria do autor

Tabela 5 – Ranking de energia livre dos modelos produzidos no *docking* molecular com os ligantes candidatos de Sf9, *Spodoptera frugiperda*, selecionados após filtragem.

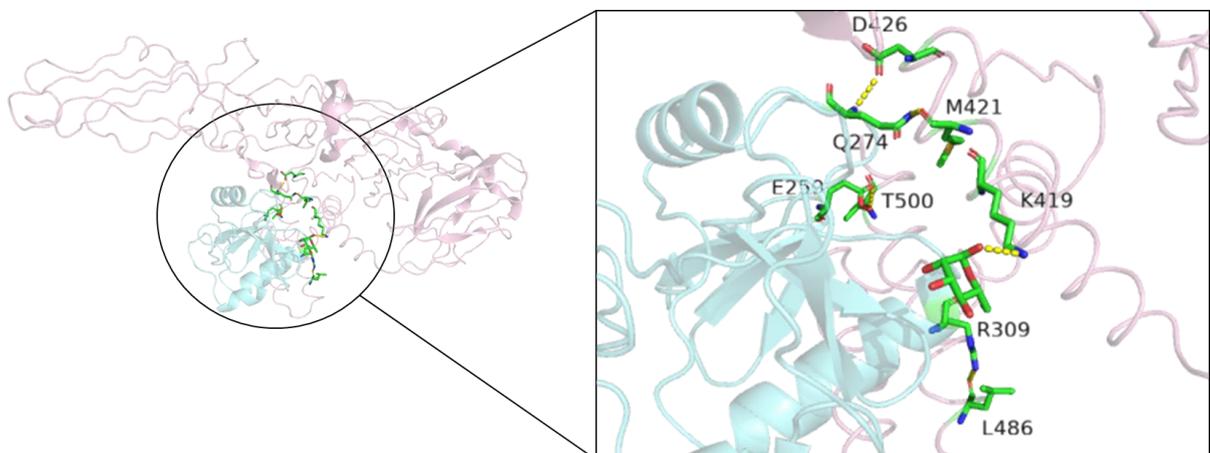
Ligantes	Energia livre dos modelos
<i>ADP/ATP translocase</i>	1 ^o = -354,92; 2 ^o = -333,63 ; 3 ^o = -332,63; 4 ^o = -327,35; 5 ^o = -321,99; 6 ^o = -320,55; 7 ^o = -317,16; 8 ^o = -316,59; 9 ^o = -316,39; 10 ^o = -314,79
<i>Glucose dehydrogenase</i>	1 ^o = -329,58 ; 2 ^o = -297,31; 3 ^o = -294,82; 4 ^o = -293,10; 5 ^o = -292,37; 6 ^o = -287,37; 7 ^o = -284,05; 8 ^o = -283,05; 9 ^o = -281,76; 10 ^o = -279,55
<i>Glutathione Transferase</i>	1 ^o = 330,18; 2 ^o = -314,95; 3 ^o = -304,02; 4 ^o = -300,19; 5 ^o = -299,12; 6 ^o = -279,00; 7 ^o = -273,41; 8 ^o = -273,10; 9 ^o = -270,53; 10 ^o = -268,29
<i>Glutathione S-transferase 1</i>	1 ^o = -312,09; 2 ^o = -288,01; 3 ^o = -285,56; 4 ^o = -284,18; 5 ^o = -282,98; 6 ^o = -276,10; 7 ^o = -271,71; 8 ^o = -268,95; 9 ^o = -268,81; 10 ^o = -268,71
<i>Prostaglandin reductase</i>	1 ^o = -266,84; 2 ^o = -259,07; 3 ^o = -250,92; 4 ^o = -250,75; 5 ^o = -249,92; 6 ^o = -244,15; 7 ^o = -243,93; 8 ^o = -229,82; 9 ^o = -229,62; 10 ^o = -228,86
<i>Tubulin alpha chain</i>	1 ^o = -223,45; 2 ^o = -221,53; 3 ^o = -218,24; 4 ^o = -217,50; 5 ^o = -215,09; 6 ^o = -212,71; 7 ^o = -210,70; 8 ^o = -210,40; 9 ^o = -209,76; 10 ^o = -207,14
<i>Heat shock 70 kDa protein cognate 5</i>	1 ^o = -235,42; 2 ^o = -235,11; 3 ^o = -224,68; 4 ^o = -223,67; 5 ^o = -217,30; 6 ^o = -213,52; 7 ^o = -211,96; 8 ^o = -207,93; 9 ^o = -206,40; 10 ^o = -207,28

Fonte: Própria do autor

Os modelos do *docking* das proteínas em comum foram submetidos a visualização com o *PyMOL*, onde foi possível observar as regiões de interação a partir da identificação dos possíveis resíduos que estão envolvidos na ligação entre o ligante e a proteína E do ZIKV. O controle positivo de interação utilizado, DC-SIGN, representado em ciano na Figura 15 com a proteína do envelope em rosa, mostrou a

região de interação entre os aminoácidos 419K, 421M, 426D, 486L e 500T da proteína do envelope e 259E, 274Q, 309R e a manose no DC-SIGN. A visualização do *docking* da proteína *Heat shock protein 70 kDa cognate 5* na Figura 16 para C6/36 demonstrou região de interação nos domínios I e na região transmembranar da proteína do envelope, os resíduos participantes são 20W, 175R, 189D, 438LN439, 447Q, 454K e 500T. Para o ligante, as interações ocorreram nos resíduos 43DT44, 46K, 65E, 73E, 77G, 178N e 571K. O *docking* para a proteína *Heat shock protein 70 kDa cognate 5* em Sf9 (Figura 17) demonstrou a interação principalmente no DIII e na região transmembrana, nos resíduos 216E, 314F, 393E, 395K, 399HW400, 403S, 418A, 461S, 476GL477, 479T e 485S na proteína E. Os resíduos envolvidos no ligante são 58R, 113R, 190N, 416R, 602K, 659Y, 666RE667, 670Q e 678Q. Em Sf9 (Figura 17), o modelo 2 foi utilizado para visualização com a *glutathione transferase*. A região de interação foi a de hélices transmembranas nos resíduos 478N, 480K, 482GS483 e 485S. O ligante interagiu nos resíduos 37K, 91D, 93K, 104Y e 108K. A *ADP/ATP translocase* identificada em C6/36 (Figura 18) exibiu interação com as hélices transmembranas nos resíduos 414T e 477L da proteína E, enquanto os resíduos da proteína ligante são 21S e 34R. A *ADP/ATP translocase* em Sf9 (Figura 19) mostrou região de interação no DIII e nas hélices transmembranares nos resíduos 364D, 401H, 403SG404, 419K e 470T. Os resíduos envolvidos na interação pelo ligante foram 112W, 128T e 254K.

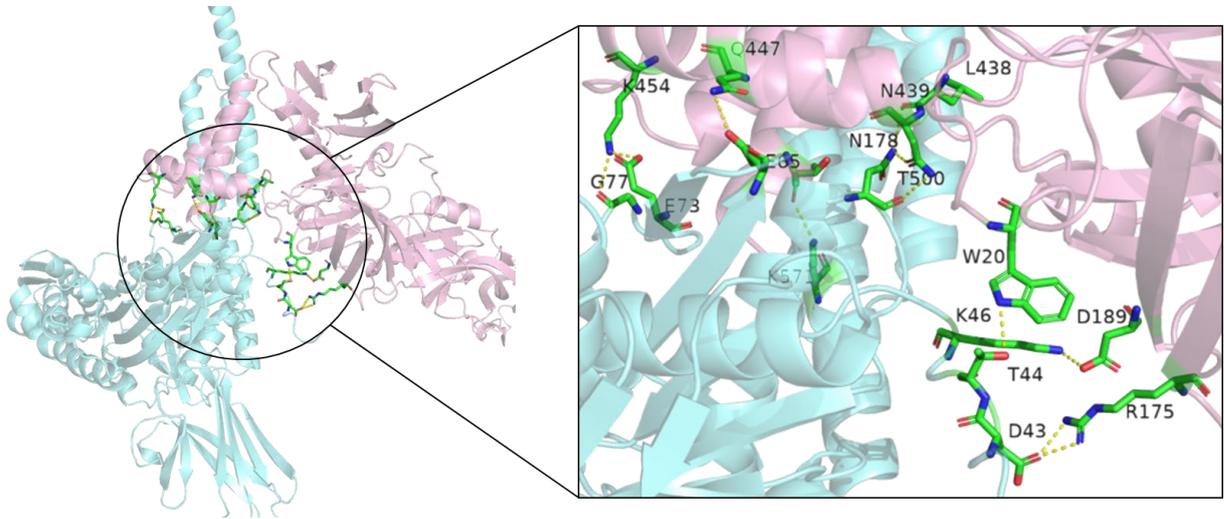
Figura 15 – Visualização do *docking* para DC-SIGN, 1º modelo.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0.

Legenda: Em rosa está representada a proteína do envelope, em ciano o ligante DC-SIGN e em verde são demonstradas as interações entre os aminoácidos.

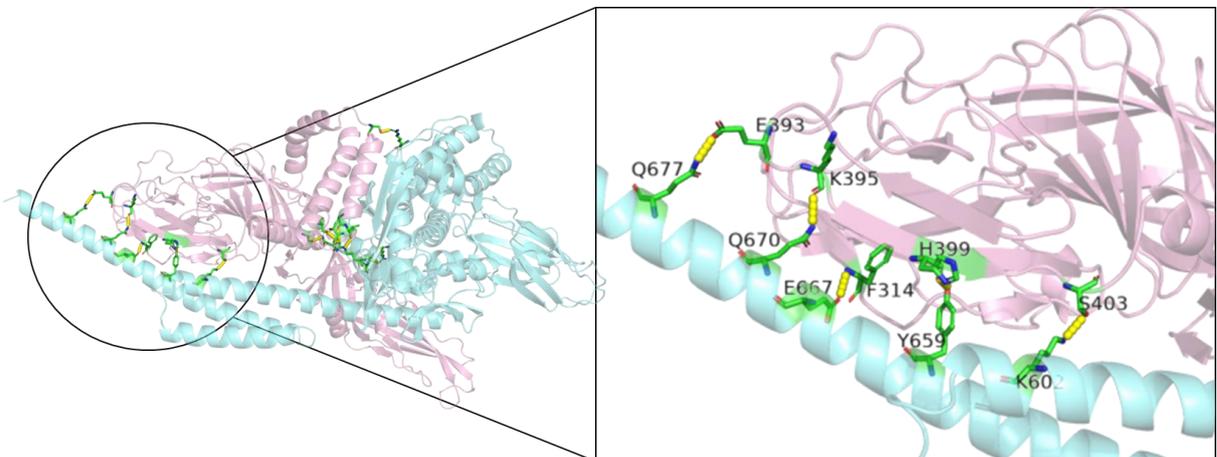
Figura 16 – Visualização do *docking*, ligante *Heat shock protein 70 kDa cognate 5*, 1º modelo em C6/36.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0.

Legenda: Em rosa está representada a proteína do envelope, em ciano o ligante *Heat shock protein 70 kDa cognate 5* e em verde são demonstradas as interações entre os aminoácidos.

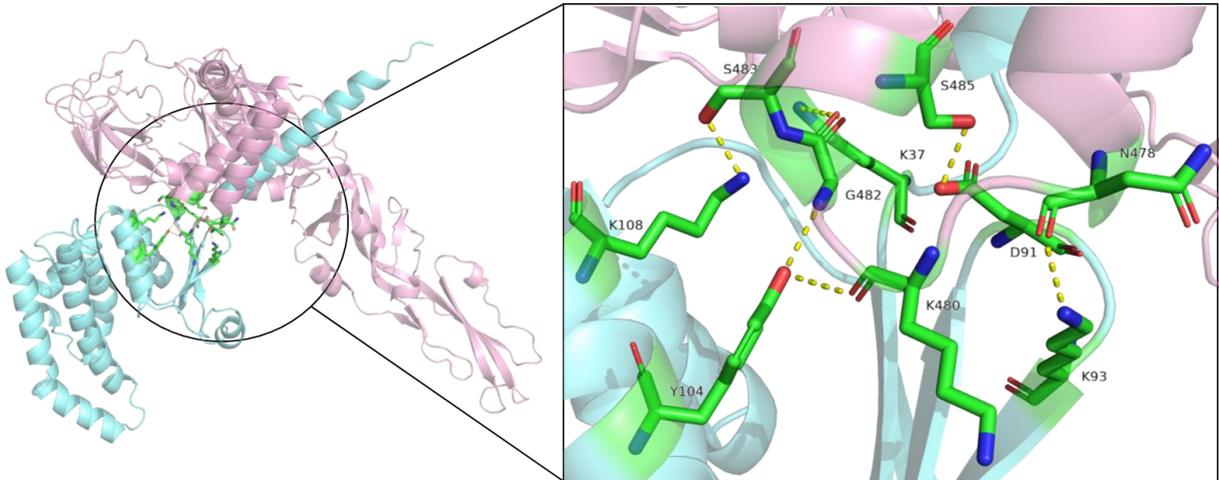
Figura 17 – Visualização *docking*, ligante *Heat shock protein 70 kDa cognate 5*, 2º modelo em Sf9.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0

Legenda: Em rosa está representada a proteína do envelope, em ciano o ligante *Heat shock protein 70 kDa cognate 5* e em verde são demonstradas as interações entre os aminoácidos.

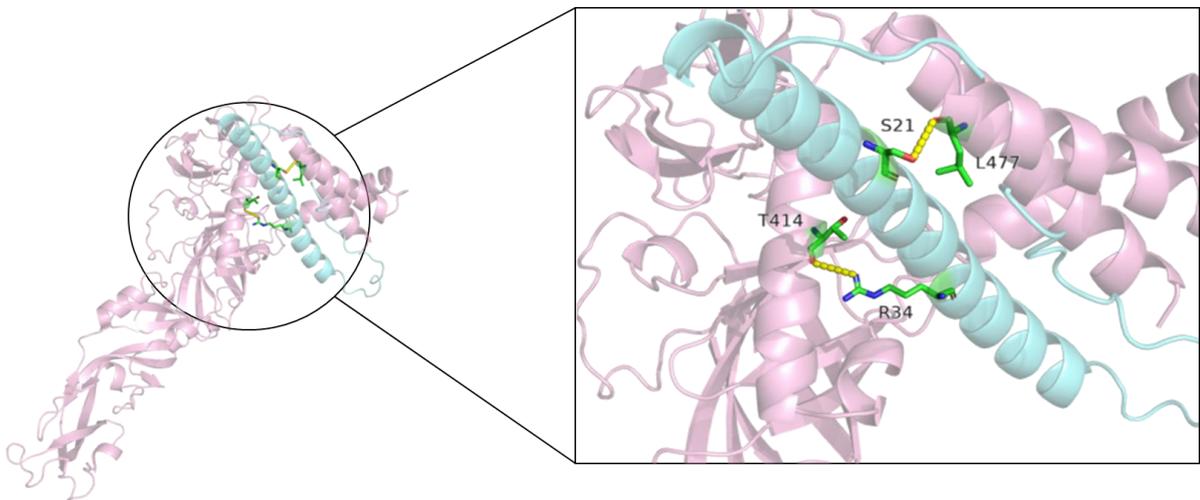
Figura 18 – Visualização *docking*, ligante *glutathione transferase*, 2^o modelo em Sf9.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0

Legenda: Em rosa está representada a proteína do envelope, em ciano o ligante *glutathione transferase* e em verde são demonstradas as interações entre os aminoácidos.

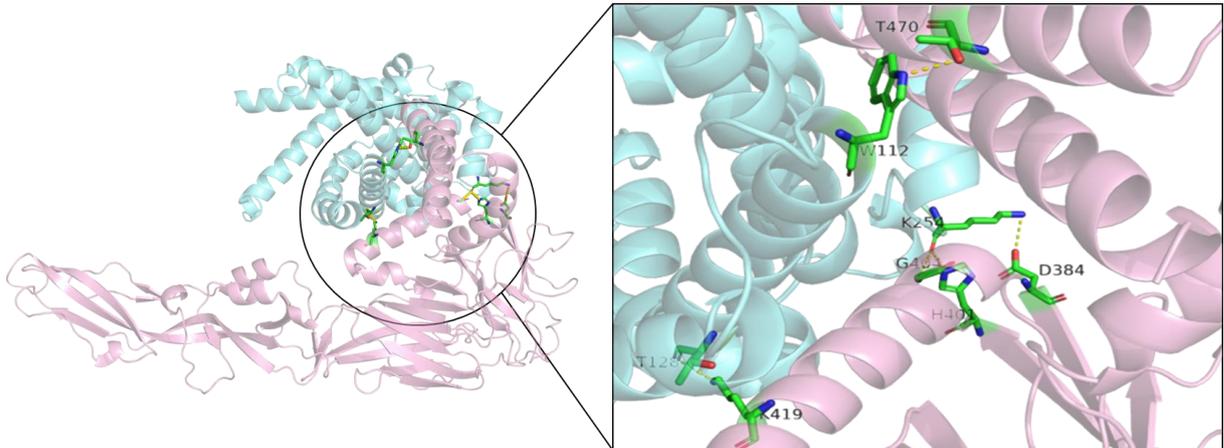
Figura 19 – Visualização *docking*, ligante *ATP/ADP translocase*, 1^o modelo em C6/36.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0

Legenda: Em rosa está representada a proteína do envelope, em ciano o ligante *ATP/ADP translocase* e em verde são demonstradas as interações entre os aminoácidos.

Figura 20 – Visualização *docking*, ligante *ATP/ADP translocase*, 3º modelo em Sf9.



Fonte: Própria do autor. Imagem gerada através da ferramenta PyMOL 3.0.

Legenda: Em rosa está representada a proteína do envelope, em ciano o ligante *ATP/ADP translocase* e em verde são demonstradas as interações entre os aminoácidos.

6 DISCUSSÃO

O processo de entrada e internalização viral, bem como o ciclo de infecção, dependem da interação específica entre a partícula viral com os fatores proteicos associados da célula hospedeira suscetível, além da permissibilidade celular. Nesse sentido, o presente estudo buscou elucidar sobre possíveis ligantes responsáveis pelo desencadeamento da internalização do ZIKV em duas linhagens celulares que possuem suscetibilidade e permissibilidade distintas a diversos arbovírus, a C6/36, suscetível à internalização do ZIKV, e a linhagem celular Sf9, que possui um perfil de resistência para alguns arbovírus. Desse modo, a ligação que ocorre entre as proteínas envolvidas no processo possui um grau de afinidade que pode determinar sua interação. A energia livre produzida sugere os estados conformacionais dos ligantes conforme sua favorabilidade. Como resultado, os ensaios de ligação de proteína do tipo *Pull-down* realizados com a utilização da proteína do envelope do ZIKV recombinante e os extratos proteicos das células C6/36 e Sf9 evidenciaram a identificação de ligantes pela espectrometria de massas entre proteínas não caracterizadas, proteínas com função de translocase de ATP, transferases e proteínas do choque térmico de 70 kilodaltons.

Os ligantes candidatos à fatores moleculares relacionados ao desenvolvimento do ZIKV nas células C6/36 e Sf9 tiveram sua estrutura predita pelo *AlphaFold2* utilizando algoritmos de inteligência artificial a partir da sequência primária e foram submetidos ao *docking molecular* pelo programa HDOCK. Não foi possível realizar a modelagem por homologia, pois os modelos estruturais depositados nos bancos de dados para as proteínas identificadas não apresentaram similaridade suficiente ou não possuíam sua estrutura predita. Dessa forma, seguiu-se para a modelagem *ab initio* baseada em aprendizagem profunda que foi capaz de produzir modelos com boa confiabilidade e validados pelos gráficos de Ramachandran apresentando-se em regiões favoráveis e permitidas.

O controle positivo para avaliar a energia livre resultante das análises por *docking molecular* foi o modelo cristalográfico do receptor de lectina em células dendríticas, DC-SIGN, que é um candidato a receptor para os *Flavivírus* pelo contato com a glicoproteína. Este receptor foi descrito como participante de vias de infecção para os vírus DENV, JEV, WNV e ZIKV por mediação da infecção em células humanas

ou células de mosquitos, no caso do JEV (Hu *et al.*, 2021). Muitos estudos reforçam a importância de sítios de glicosilação para a infecção mediada pela proteína E com a superfície celular do hospedeiro, incluindo DC-SIGN. A glicosilação é uma modificação pós-traducional das partículas virais que podem promover a infecção ao induzir as funções virais como transporte, fusão, expressão e ligação à superfície celular. Essa modificação ocorre pela ancoragem de glicanos nas proteínas. A proteína E, responsável pela entrada viral, possui dois principais sítios de glicosilação para os *Flavivírus* nos resíduos de asparagina na posição 57 e 153. Para o ZIKV, os glicanos presentes na glicoproteína favorecem a secreção efetiva da proteína (Feng *et al.*, 2022). Entretanto, alguns estudos ainda são contraditórios no que diz respeito à necessidade da glicosilação. A infecção pelo WNV nas células de mamífero com a proteína E glicosilada, por exemplo, pode influenciar a patogênese e a sua supressão diminuir a infecção, enquanto que a atividade da infecção não é afetada nas células de mosquito por presença ou supressão dessa modificação (Fontes-Garfias *et al.*, 2017). Quanto à ligação ao receptor celular, a N-glicosilação pode não ser tão importante. Para o DENV, a porção responsável pela ligação, DIII, não possui sítios de glicosilação. Ainda, outros estudos desenvolvidos por Chen *et al.* (1997) relataram que a desglicosilação da proteína E do DENV recombinante não tem influência na interação com os receptores celulares, enquanto que para a interação no DC-SIGN são requisitados resíduos de aminoácidos glicosilados (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003). Nesse estudo, a proteína recombinante utilizada nos ensaios não possui sítios de glicosilação, entretanto, buscou-se analisar se os dados corroboram com a literatura e avaliar comparativamente os resultados deste controle com a proteína E e os resultados dos nossos ligantes derivados da interação nas células de inseto. Para o vírus da dengue, as ligações que ocorrem entre a proteína E e o receptor são ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e também há a interação com os carboidratos presentes no DC-SIGN. Um resíduo importante no DC-SIGN é o 313F, relatado como principal resíduo envolvido na ligação à proteína do envelope do ZIKV na região transmembrana e resíduos 442L, 443F, 444G e 446M (Menechino *et al.*, 2023). Como resultado, no *docking* molecular realizado neste trabalho entre a proteína E do ZIKV e o DC-SIGN complexado a manose, foi possível observar interação com o açúcar e interação de resíduos na região transmembrana da proteína do envelope. Este resultado inicial corrobora com os estudos de Menechino *et al.* (2023). No *docking* molecular, quanto menor a energia livre maior a afinidade entre os resíduos

do ligante e do receptor, a energia livre do modelo DC-SIGN foi em torno de aproximadamente -270 e todas as proteínas ligantes selecionadas também tiveram valor próximo ou inferior a este de energia livre.

As proteínas do choque térmico, do inglês *Heat shock proteins* (HSP), são proteínas com atividade de chaperona, induzidas em resposta aos estresses celulares como temperatura, hipóxia, mudança de meio e patógenos. Elas são divididas de acordo com seu peso molecular, como as HSPs médias, HSP60 e HSP70, e são responsáveis por reparar e proteger a estrutura das proteínas contra um agente agressor (Lubkowska *et al.*, 2021). A proteína de choque térmico de peso molecular 70kDa foi identificada em diversos *Flavivirus* incluindo DENV, JEV, vírus da hepatite C (HCV), e ZIKV como um fator ligante na superfície celular direto ou indireto, além de estar associada a produção de vírions como no HCV (Lubkowska *et al.*, 2021; Anwar *et al.*, 2022). Os estudos de Puhjari *et al.* (2019) demonstraram que o bloqueio da HSP70 com anticorpo específico ou a pré-incubação com a HSP70 recombinante reduziu significativamente a infecção viral pelo ZIKV. Além disso, a redução nas unidades de formação de placas no ensaio de infecção também corrobora com a possibilidade dessa proteína do choque térmico ser um fator essencial para a ligação e invasão do ZIKV nas células do hospedeiro (Puhjari *et al.*, 2019). Assim, a identificação da proteína do choque térmico pelo ensaio de ligação em ambas as células C6/36 e Sf9, realizados nesse estudo, indicam a sua possível participação no ciclo infeccioso viral do ZIKV ou outros *Flavivirus* em invertebrados.

Para a sobrevivência em um meio distinto, os vírus utilizam a maquinaria das células para tornar o ambiente favorável para sua replicação. As mitocôndrias são organelas envolvidas na produção de energia e na imunidade inata nas células, entretanto, elas também podem ser influenciadas por mecanismos externos como resposta a uma infecção viral, estresse oxidativo, hipóxia, entre outros. A relação da alteração na dinâmica mitocondrial foi estudada para um integrante dos *Flavivirus*, o vírus da Hepatite C, como uma via de infecção persistente, além de alguns vírus de famílias distintas como o vírus da Hepatite B e o vírus sincicial respiratório (Elsela; Lukacs, 2021). A translocase de ADP e ATP é uma proteína pertencente à família de carreadores mitocondriais, responsáveis por regular o equilíbrio entre a quantidade de ATP no citosol da célula e o ADP que está na matriz mitocondrial. Em contato com o substrato, diversas mudanças conformacionais são induzidas nos transportadores para garantir que sua função seja realizada corretamente. Contudo, sua base

molecular não está totalmente compreendida, assim, é necessária também a investigação em como mutações na sua estrutura induzidas por patógenos podem influenciar esse transporte (Ruprecht *et al.*, 2019).

Dessa forma, o presente estudo demonstrou a interação da proteína E do ZIKV, em dois perfis de células distintas, com proteínas de diferentes funções celulares. As proteínas identificadas foram *ADP/ATP translocase*, *Heat shock 70 kDa protein cognate 5*, *Uncharacterized proteins*, *Prostaglandin reductase*, *Glutathione transferase*, entre outras. Algumas dessas moléculas como a *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* possuem investigações mais bem estabelecidas na literatura quanto sua atuação no ciclo de infecção de diversos vírus. Por outro lado, muitas das proteínas identificadas não têm seu papel elucidado, sendo necessária a validação funcional *in vitro* para confirmar os resultados descobertos pela simulação *in silico* por *docking* molecular. Os achados vem a contribuir para a construção do conhecimento acerca do ciclo de infecção do ZIKV e outros *Flavivirus*.

7 CONCLUSÃO

Os extratos de proteínas e frações de membrana das células C6/36 e Sf9 foram obtidos com sucesso, assim como avaliações de integridade e quantificação da proteína do envelope recombinante também foram realizadas com sucesso. Os ensaios de *western-blotting* permitiram a imunodeteção da proteína do envelope recombinante confirmando sua especificidade. Ademais, os resultados do ensaio de ligação do tipo *Pull-down* demonstraram que houve interações das proteínas extraídas com a proteína recombinante ENV-GST utilizada como agente de captura neste experimento. Por fim, diversos ligantes foram identificados pela análise de espectrometria de massas, manualmente filtrados e submetidos a análise *in silico* por ferramentas de atracamento molecular. O *docking* molecular realizado permitiu uma varredura inicial das proteínas ligantes candidatas a fatores moleculares participantes do ciclo de infecção nas células de inseto C6/36 e Sf9. É necessário investigar os ligantes *ADP/ATP translocase*, *Glutathione transferase*, *Prostaglandin reductase* e *Heat shock 70 kDa protein cognate 5* presentes em ambas as linhagens com mais ensaios para compreender sua função no mecanismo de infecção e transmissão vetorial do ZIKV em mosquitos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, Samantha E. *et al.* Serologic evidence of arthropod-borne virus infections in wild and captive ruminants in Ontario, Canada. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 5, p. 2100, 2020.
- AMRAOUI, Fadila *et al.* Potential of *Aedes albopictus* to cause the emergence of arboviruses in Morocco. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0006997, 2019.
- ANWAR, Muhammad Naveed *et al.* The interactions of flaviviruses with cellular receptors: Implications for virus entry. **Virology**, v. 568, p. 77-85, 2022.
- CARPENTER, Alexis; CLEM, Rollie J. Factors affecting arbovirus midgut escape in mosquitoes. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 220, 2023.
- Countries and Territories at Risk for Zika. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/geo/index.html>. Acesso em: 10 de junho de 2024.
- CHALA, Bayissa; HAMDE, Feyissa. Emerging and re-emerging vector-borne infectious diseases and the challenges for control: a review. **Frontiers in public health**, v. 9, p. 715759, 2021.
- CHAN, Kai Rol *et al.* Serological cross-reactivity among common flaviviruses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 975398, 2022.
- CHEN, Yaping; MAGUIRE, Terry; MARKS, Rory M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8765-8772, 1996.
- CORDERO-RIVERA, Carlos Daniel *et al.* The importance of viral and cellular factors on flavivirus entry. **Current Opinion in Virology**, v. 49, p. 164-175, 2021.
- DU, Senyan *et al.* *Aedes* mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1324, 2019.
- ELESELA, Srikanth; LUKACS, Nicholas W. Role of mitochondria in viral infections. **Life**, v. 11, n. 3, p. 232, 2021.
- FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.
- FENG, Tingting *et al.* Glycosylation of viral proteins: Implication in virus–host interaction and virulence. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 670-683, 2022.
- FONTES-GARFIAS, Camila R. *et al.* Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. **Cell reports**, v. 21, n. 5, p. 1180-1190, 2017.

- FU, Da-wei; ZHANG, Peng-fei. Establishment and characterization of Japanese B encephalitis virus persistent infection in the Sf9 insect cell line. **Biologicals**, v. 24, n. 3, p. 225-233, 1996.
- GEISLER, Christoph; JARVIS, Donald L. Adventitious viruses in insect cell lines used for recombinant protein expression. **Protein expression and purification**, v. 144, p. 25-32, 2018.
- GIRALDO, Maria I.; GONZALEZ-OROZCO, Maria; RAJSBAUM, Ricardo. Pathogenesis of Zika virus infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, p. 181-203, 2023.
- GIRALDO, Maria I. *et al.* Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. **Nature**, v. 585, n. 7825, p. 414-419, 2020.
- HUANG, Yan-Jang S.; HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current opinion in virology**, v. 34, p. 104-109, 2019.
- HUANG, Yan-Jang S.; HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 22, 2019.
- HU, Tao *et al.* The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: Viral entry. **Virology journal**, v. 18, n. 1, p. 136, 2021.
- JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.
- KING, Emily Louise; IRIGOYEN, Nerea. Zika Virus and Neuropathogenesis: The Unanswered Question of Which Strain Is More Prone to Causing Microcephaly and Other Neurological Defects. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 695106, 2021.
- KUHN, R. *et al.* (2023). A Prototype-Pathogen Approach for the Development of *Flavivirus* Countermeasures. **The Journal of infectious diseases**, v. 228, n. 6, S398–S413, 2023.
- LEWIS, Juliette *et al.* Intrinsic factors driving mosquito vector competence and viral evolution: a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1330600, 2023.
- LI, Jin; FU, Ailing; ZHANG, Le. An overview of scoring functions used for protein–ligand interactions in molecular docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, p. 320-328, 2019.
- LIU, Zhong-Yu; SHI, Wei-Feng; QIN, Cheng-Feng. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 131-139, 2019.
- LUBKOWSKA, Anna *et al.* Role of heat shock proteins (HSP70 and HSP90) in viral

infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9366, 2021.

LWANDE, Olivia Wesula *et al.* Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 2, p. 71-81, 2020.

MA, Xiao; YUAN, Zhenghong; YI, Zhigang. Identification and characterization of key residues in Zika virus envelope protein for virus assembly and entry. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 1604-1620, 2022.

MENECHINO, Bruno Stein Barbosa *et al.* Interactions between DC-SIGN and the envelope protein from Dengue and Zika viruses: a structural perspective based on molecular dynamics and MM/GBSA analyses. **Virology journal**, v. 20, n. 1, p. 286, 2023.

MILLER, Jason R. *et al.* Analysis of the *Aedes albopictus* C6/36 genome provides insight into cell line utility for viral propagation. **Gigascience**, v. 7, n. 3, p. gix135, 2018.

NÄSLUND, Jonas *et al.* Emerging mosquito-borne viruses linked to *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: global status and preventive strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 21, n. 10, p. 731-746, 2021.

NAVARRO-SANCHEZ, Erika *et al.* Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO reports**, v. 4, n. 7, p. 723-728, 2003.

OLIVEIRA, Lilian G.; PERON, Jean Pierre Schatzmann. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 695-701, 2019.

OWCZAREK, Katarzyna *et al.* Zika virus: mapping and reprogramming the entry. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, p. 1-19, 2019.

PARK, Ki Beom *et al.* Current trends in large-scale viral surveillance methods in mosquitoes. **Entomological Research**, v. 50, n. 6, p. 292-308, 2020.

PATEL, Dharmeshkumar; PATEL, Jagdish Suresh; YTREBERG, F. Marty. Implementing and assessing an alchemical method for calculating protein–protein binding free energy. **Journal of chemical theory and computation**, v. 17, n. 4, p. 2457-2464, 2021.

PEPE, Vera Lucia Edais *et al.* Proposal for integrated analysis of public health emergencies involving arboviruses: the case of the Zika virus in Brazil. **Saúde em Debate**, v. 44, p. 69-83, 2021.

PIELNAA, Paul *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34-42, 2020.

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796-812, 2020.

PINDI, Chinmai; CHIRASANI, Venkat R.; SENAPATI, Sanjib. Identifying crucial E-protein residues responsible for unusual stability of Zika virus envelope. **Biophysical Journal**, v. 120, n. 18, p. 4041-4054, 2021.

PUJHARI, Sujit *et al.* Heat shock protein 70 (Hsp70) mediates Zika virus entry, replication, and egress from host cells. **Emerging microbes & infections**, v. 8, n. 1, p. 8-16, 2019.

PUTITA, O. Tey *et al.* Replication variance of African and Asian lineage Zika virus strains in different cell lines, *Aedes aegypti* mosquitoes and neonatal mice. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 515, 2020.

REY, Félix A.; STIASNY, Karin; HEINZ, Franz X. *Flavivirus* structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current opinion in virology**, v. 24, p. 132-139, 2017.

RUPRECHT, Jonathan J. *et al.* The molecular mechanism of transport by the mitochondrial ADP/ATP carrier. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 435-447. e15, 2019.

SÁFADI, Marco Aurélio Palazzi; ALMEIDA, Flavia J. The Zika Virus Epidemic Four Years After: Where are We?. **American Journal of Perinatology**, v. 36, n. S 02, p. S4-S8, 2019.

SIDDIQUE, Rabeea *et al.* Zika virus potentiates the development of neurological defects and microcephaly: Challenges and control strategies. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 319, 2019.

SIEBENMORGEN, Till; ZACHARIAS, Martin. Computational prediction of protein–protein binding affinities. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Computational Molecular Science**, v. 10, n. 3, p. e1448, 2020.

TELEHANY, Stephen M. *et al.* Identification of Zika virus inhibitors using homology modeling and similarity-based screening to target glycoprotein E. **Biochemistry**, v. 59, n. 39, p. 3709-3724, 2020.

VALENZUELA-LEON, Paola Carolina *et al.* Multiple salivary proteins from *Aedes aegypti* mosquito bind to the Zika virus envelope protein. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 221, 2022.

VAN DEN ELSEN, Kain; QUEK, Jun Ping; LUO, Dahai. Molecular insights into the *flavivirus* replication complex. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 956, 2021.

VAN LEUR, Sophie Wilhelmina *et al.* Pathogenesis and virulence of *flavivirus* infections. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2814-2838, 2021.

VIGLIETTA, Marine *et al.* Vector specificity of arbovirus transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 773211, 2021.

VAUGHN, J. L. *et al.* The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). **In vitro**, v. 13, n. 4, p. 213-217, 1977.

WICHIT, Sineewanlaya *et al.* Chikungunya and Zika viruses: Co-circulation and the interplay between viral proteins and host factors. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 448, 2021.

YAN, Yumeng *et al.* The HDock server for integrated protein–protein docking. **Nature protocols**, v. 15, n. 5, p. 1829-1852, 2020.

Vector-borne diseases. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em 10 de junho de 2024.

ZHANG, Peng-fei *et al.* Susceptibility of the Sf9 insect cell line to infection with adventitious viruses. **Biologicals**, v. 22, n. 3, p. 205-213, 1994.

ZHANG, Peng-fei *et al.* St Louis encephalitis virus establishes a productive, cytopathic and persistent infection of Sf9 cells. **Journal of general virology**, v. 74, n. 8, p. 1703-1708, 1993.

ZHAO, Rong *et al.* *Flavivirus*: from structure to therapeutics development. **Life**, v. 11, n. 7, p. 615, 2021.