



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS E MECANISMOS  
IMUNOINFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO DE CÉLULAS DA  
MICROGLIA PELAS CEPAS AFRICANA E ASIÁTICA DO VÍRUS ZIKA**

Fernanda Bellaniza Caminha de Oliveira

Dissertação de Mestrado

BRASÍLIA - DF

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE MICRORNAs E MECANISMOS  
IMUNOINFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO DE CÉLULAS DA  
MICROGLIA PELAS CEPAS AFRICANA E ASIÁTICA DO VÍRUS ZIKA

Fernanda Bellaniza Caminha de Oliveira

Dissertação de Mestrado  
apresentada como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de  
mestre em Patologia Molecular do  
programa de pós-graduação da Faculdade  
de Ciências da Saúde da Universidade de  
Brasília (UnB).

Orientador: Enrique Roberto Argañaraz.

BRASÍLIA - DF

2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Enrique Argañaraz, por ter me recebido em seu laboratório e encarado esse projeto novo comigo. Por sempre correr atrás das nossas necessidades e nunca poupar esforços para que as coisas acontecessem. Por procurar colaborações sempre que não podia nos orientar, por atender aos nossos pedidos, ouvir nossas reclamações, dúvidas e desesperos. Obrigada!

Gostaria de agradecer ao professor Marcelo Bozza por abrir as portas do seu laboratório na Universidade Federal do Rio de Janeiro sempre que precisei e por me apresentar as pessoas que mais me inspiraram nesse mestrado. Agradecer, também, à professora Luciana Arruda pela orientação e imensa ajuda. Sem ela e seus alunos, os experimentos com o vírus Zika não seriam possíveis.

O meu muito obrigada para Ana Luísa Cardoso, Ph.D. do Centro de Neurociências e Biologia Celular, que me acolheu superbem quando estive na Universidade de Coimbra e por ser a pessoa mais solícita que já conheci. Sempre me respondeu tão rápido que nem parecia estar do outro lado do oceano, com fuso horário tão diferente. Mesmo de Portugal, nunca mediu esforços para que nossas colaborações dessem certo. Muitos beijinhos!

Obrigada a todos da Universidade de Brasília por me ajudarem de alguma forma, emprestando algum equipamento, reagente ou ensinando algum protocolo. A colaboração de vocês é indispensável. Muito grata!

Agradecer imensamente aos meus amigos do laboratório de Neurovirologia Molecular, especialmente à Vanessa, que fizeram os dias de trabalho muito mais divertidos. Aos que tiveram uma curta passagem, porém marcante; e aos que ficaram comigo todos os dias, não só pela companhia, mas pelo companheirismo, pela ajuda nos momentos difíceis, pela empatia e amizade. Obrigada pelos momentos de concentração e descontração. Vocês foram essenciais nessa caminhada e espero sempre tê-los em minha vida!

Ao CNPq, pelo fomento, e à FAPDF, pelo apoio financeiro às idas ao RJ e a Portugal.

Finalmente, gostaria de dedicar a finalização desse trabalho à minha família e amigos, principalmente à minha mãe e ao meu namorado, os quais tiveram paciência comigo em todos os dias de estresse, que foram muitos. Essa conquista é muito importante para mim e sei que para vocês também. Obrigada por acreditarem em mim mais do que eu mesma.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE QUADROS .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	6
LISTA DE SÍMBOLOS.....	121
RESUMO .....	132
ABSTRACT.....	143
<b>1. Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. O vírus da Zika.....</b>	<b>14</b>
1.1.1. Epidemiologia: histórico da doença.....	14
1.1.2. Classificação filogenética .....	18
1.1.3. Estrutura e Genoma.....	20
1.1.4. Replicação viral .....	24
1.1.5. Resposta Imune .....	27
1.1.5.1. Resposta Imune Inata .....	27
1.1.5.2. Resposta Imune Adaptativa .....	32
1.1.6. Mecanismos de Evasão Viral.....	35
1.1.7. Patogênese do Zika .....	36
1.1.8. Vírus Zika e o Sistema Nervoso Central .....	38
1.1.8.1. SNC e Micróglia.....	42
<b>1.2. MicroRNAs e Infecções Virais .....</b>	<b>44</b>
1.2.1. microRNAs e a Resolução da Inflamação via TLR.....	49
1.2.2. miRNAs nas Infecções por Flavivírus .....	51
<b>2. Relevância da Pesquisa .....</b>	<b>52</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>52</b>
3.1. Objetivos específicos .....	52
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>53</b>
4.1. Cultura de células.....	53
4.2. Manutenção e propagação do vírus Zika .....	53
4.3. Titulação viral por ensaio de placa de lise (PFU) .....	54
4.4. Infecção de BV2 com ZIKV .....	54
4.5. Ensaio de viabilidade celular utilizando o teste de XTT.....	55
4.6. Avaliação da replicação viral .....	55

<b>4.7. Quantificação da expressão de microRNAs e mediadores inflamatórios em BV2 infectadas por ZIKV .....</b>	<b>56</b>
<b>4.8. Análise Estatística .....</b>	<b>57</b>
<b>4.9. Análise qualitativa de CD68, Iba-1 e MHC-II por imunocitoquímica .....</b>	<b>58</b>
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1. Produção de ZIKV.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2. ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> não induzem citotoxicidade em células BV2.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3. ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> não replicam de forma eficiente em BV2.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4. As cepas ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> induzem a expressão de marcadores de ativação em células BV2.....</b>	<b>63</b>
<b>5.5. A infecção de ZIKV altera a expressão de microRNAs em células BV2.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>76</b>
<b>7. Perspectivas Futuras.....</b>	<b>78</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Surto de Zika vírus, janeiro 2016.....	17
<b>Figura 2.</b>	Análise filogenética do genoma completo do vírus Zika.....	18
<b>Figura 3.</b>	Estrutura do vírion e composição do genoma viral do Zika.....	21
<b>Figura 4.</b>	Clivagem de prM durante a maturação do vírus.....	23
<b>Figura 5.</b>	Adesão do ZIKV ao hospedeiro e o papel dual dos receptores TAM ...	25
<b>Figura 6.</b>	Ciclo de replicação viral.....	26
<b>Figura 7.</b>	Resposta imune inata contra o vírus Zika.....	30
<b>Figura 8.</b>	Os microRNAs funcionam em conjunto com outros mecanismos para controlar a expressão dos componentes de sinalização TLR.....	31
<b>Figura 9.</b>	Duas proteínas do ZIKV, NS4A e NS4B, inibem a sinalização de Akt-mTOR.....	37
<b>Figura 10.</b>	MicroRNAs envolvidos nas respostas inflamatórias da micróglia.....	46
<b>Figura 11.</b>	Controle de citocinas induzidas por TLRs e sinalização de IL-1 mediado por miRNAs.....	48
<b>Figura 12.</b>	Papel dos miRNAs na resolução da inflamação desencadeada pelos TLRs.....	50
<b>Figura 13.</b>	Ajuste fino da sinalização de TLR4 pelos miR-155 e miR-21.....	51
<b>Figura 14.</b>	Titulação do ZIKV por ensaio de placa de lise (PFU).....	59
<b>Figura 15.</b>	Viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de XTT.....	60
<b>Figura 16.</b>	Cinética de avaliação da replicação viral do ZIKV em BV2.....	62
<b>Figura 17.</b>	Avaliação da ativação das células BV2 induzida por ZIKV.....	64
<b>Figura 18.</b>	Relação inversa entre título viral e cópias de RNA de CD68.....	66

<b>Figura 19.</b>	Teste de integridade do RNA.....	67
<b>Figura 20.</b>	Alteração da expressão do miR-155 e seus alvos SOCS1, SHIP1 e IL-10 em células BV2 pela infecção do ZIKV.....	68
<b>Figura 21.</b>	Alteração da expressão do miR-125 e seu alvo TNF- $\alpha$ em células BV2 pela infecção do ZIKV.....	71
<b>Figura 22.</b>	Alteração da expressão do miR-146a e seus alvos TRAF6, IRAK1 e IFN- $\gamma$ em células BV2 pela infecção do ZIKV.....	72
<b>Figura 23.</b>	Alteração da expressão do miR-132 em células BV2 pela infecção do ZIKV.....	74
<b>Figura 24.</b>	Alteração da expressão dos miR-155, miR-146a, miR-132, miR-125b agrupados por tempo de infecção da cepa do ZIKV em células BV2....	75

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Sequência de iniciadores e sonda utilizados para ensaio de PCR em tempo real.....	59
------------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	<i>Aedes</i>
AP-1	Proteína Ativadora 1
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
BMECs	Células Endoteliais da Microvasculatura Cerebral
C	Capsídeo
CD	Célula Dendrítica
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CHIKV	Chikungunya vírus
CSF	Fluido Cérebro-espinhal
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CX3CL	Ligante da Quimiocina CX3C
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Vírus da Dengue
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSS	Síndrome do Choque da Dengue
E	Envelope
EBOV	Ebola Vírus
ER	Retículo Endoplasmático
EUA	Estados Unidos da América
Gas6	<i>Growth-arrest-specific 6</i>
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
gp23	Glicoproteína de 23-kilodaltons
gp46	Glicoproteína de 46-kilodaltons
HLA	Antígeno leucocitário Humano
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

Iba1	Molécula Adaptadora de Ligação ao Cálcio Ionizado 1
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
IRAK1	Quinase 1 Associada ao receptor de IL-1
IRF	Fator Regulador de Interferon
ISGs	Genes estimulados por Interferon
ISREs	Elementos de Resposta Estimulados por Interferon
JAKs	Janus quinases
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
JNK	Quinase c-Jun-N-terminal
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT-CD8 <sup>+</sup>	Linfócito T com Cluster de Diferenciação 8 presente
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MDA-5	Proteína associada à diferenciação do melanoma 5
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
miR/miRNA	microRNA
mNS1	Homodímero de NS1 associado à membrana
MOI	multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	via da rapamicina em mamíferos
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
nAbs	Anticorpos Neutralizantes
NF-κB	Fator Nuclear κB
NGF	Fator de Crescimento Neural
NK	Célula Natural Killer
NLRs	Receptores Semelhantes à NOD
NO	Óxido Nítrico

NPCs	Células Progenitoras Neurais
NS	Proteína Não Estrutural
NSC	Célula Progenitora Neural
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase de Leitura Aberta
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salino
PC	Fosfatidilcolina
pCDs	Células Dendríticas Plasmocitóides
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PFA	Paraformaldeído
PFU	Unidades Formadoras de Placa
PMS	Phenazine Methosulfate
prM	pré-membrana
ProS	Proteína S dependente de vitamina K
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
PtdSer	Fosfatidilserina
qPCR	PCR quantitativa
RIG1	Gene induzível pelo ácido retinóico 1
RLRs	Receptores Semelhantes à RIG
RNAi	RNA de interferência
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RT	Transcrição Reversa
SCZ	Síndrome Congênita do ZIKV
SFB	Soro Fetal Bovino
sfRNA	RNA Subgenômico de Flavivirus
SHIP1	Src Homology 2- containing inositol 5' polyphosphatase 1
SNC	Sistema Nervoso Central
sNS1	NS1 secretada

SOCS	Supressor da Sinalização de Citocinas
SOD	Superóxido Dismutase
ssRNA+	Fita simples de RNA de senso positivo
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
Sup	Sobrenadante
TAB	Proteína de ligação da quinase 1 ativada por TGF-Beta
TAM	Tyro3, AXL e Mer
TBK1	Quinase ligadora de TANK 1
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador $\beta$
TGN	Rede Trans-Golgi
Th	Linfócito TCD4 ou Linfócito T auxiliar
TIM	<i>T-cell Immunoglobulin and Mucin domain</i>
TJ	Junção Celular
TLRs	Receptores Semelhantes à TOLL
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	Fator Associado ao Receptor de TNF 6
TRIF	Molécula adaptadora indutora de Interferon contendo o domínio TIR
UTR	Regiões não Traduzidas
VLPs	Partículas Semelhantes a Vírus
WNV	Vírus do Nilo do Oeste
XRN1	Exoribonuclease 1
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4- Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika Vírus
ZIKV PE243	ZIKV isolado em Pernambuco do paciente número 243
ZIKVMR766	ZIKV isolado em Uganda do macaco número 766

## LISTA DE SÍMBOLOS

Nº	Número
°C	Graus Celsius
kb	Quilobases
-/-	Nocaute
kDa	QuiloDaltons
~	Aproximadamente
nt	Nucleotídeos
p.i.	Pós infecção
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
>	Maior que
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
%	Porcento
pb	Pares de bases
Δ	Variação

## RESUMO

Nos últimos anos, o surgimento, ou ressurgimento, de diferentes arboviroses gerou um alerta global. À diferença da infecção por outros flavivírus, a infecção pelo vírus zika (ZIKV) pode ocasionar alterações neurológicas, tais como malformações cerebrais em neonatos de mães infectadas durante a gravidez, incluindo encefalite, mielite e microcefalia, conhecidas como síndrome congênita do Zika (SCZ). Também foram relatadas outras alterações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré em adultos. A microcefalia é uma desordem de células progenitoras neurais desencadeada por ZIKV da estirpe brasileira, a qual pode atravessar a placenta e induzir neuroinflamação e ativação microglial. Vírus da cepa africana também mostrou ser capaz de infectar células-tronco humanas pluripotentes *in vitro* e induzir a morte celular por apoptose, entretanto, não foram relatados casos de SCZ associados a esta cepa. Estes dados juntos com as poucas informações disponíveis a respeito dos mecanismos de neurodegeneração envolvidos nos distúrbios neurológicos e o envolvimento de miRNAs em processos neuroinflamatórios desencadeados por infecções virais, nos levaram a realizar uma análise comparativa por qPCR da expressão de miRNAs envolvidos na resposta inflamatória, assim como seus alvos celulares, após infecção de células imortalizadas da micróglia com ZIKV das cepas africana e asiática.

Neste trabalho foi possível observar que os isolados da cepa africana (ZIKV<sub>MR766</sub>) e asiática (ZIKV<sub>PE243</sub>) são capazes de infectar células da micróglia de camundongos da linhagem BV2 e produzir vírus infecciosos, embora em níveis menores que os descritos para outros tipos celulares e não induzir efeitos citopatogênicos. Ambas os isolados induziram a expressão dos marcadores de ativação Iba1, CD68, enquanto a expressão do MHC-II foi induzida apenas pelo ZIKV<sub>MR766</sub>. A infecção pelo ZIKV mostrou induzir a expressão diferencial dos miRNAs 155, 146a, 132 e 125b, assim como dos respectivos alvos celulares envolvidos na regulação da resposta imune inata. A infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub> mostrou induzir níveis maiores dos miRNAs que os induzidos pelo ZIKV<sub>PE243</sub>, especialmente do miR-146a em 24h (>7 folds). Também, ambos os isolados mostraram induzir um padrão diferencial na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-10.

Esperamos que as diferenças observadas entre os isolados das duas cepas do ZIKV nos auxiliem, numa etapa posterior, a esclarecer os mecanismos moleculares envolvidas na doença ou proteção, virulência, tropismo tecidual, patologia, e evasão imune.

**Palavras-chave:** vírus Zika, microRNA, microglia, resposta imune, neuroinflamação.

## ABSTRACT

In recent years, the emergence, or resurgence, of different arboviruses has generated a global alert. In contrast to infection with other flaviviruses, Zika virus (ZIKV) infection may cause neurological changes such as brain malformations in children of infected mothers during pregnancy, including encephalitis, myelitis, and microcephaly, known as Zika congenital syndrome (SCZ). Other neurological changes, such as Guillain-Barré syndrome, have also been reported. Microcephaly is a disorder of neural progenitor cells triggered by the Brazilian lineage (ZIKV<sub>PE243</sub>), which can cross the placenta and induce neuroinflammation and microglial activation. The African strain (ZIKV<sub>MR766</sub>) has also been shown to be able to infect pluripotent human stem cells in vitro and trigger cell death by apoptosis; however, no cases of SCZ associated to this lineage have been reported. These data, paired to the limited information available on mechanisms of neurodegeneration involved in neurological disorders, and the involvement of miRNAs in neuroinflammatory processes triggered by viral infections, led us to perform a qPCR to compare the miRNAs expression involved in the inflammatory response, as well as their cell targets, after infection of microglia-BV2 cells with the African and Asian strains of the Zika virus.

In this work it was possible to observe that the ZIKV<sub>MR766</sub> and ZIKV<sub>PE243</sub> strains are capable of infecting BV2 lineage microglial cells and producing infectious viral particles, although at levels lower than those described in other cell types besides not inducing cytopathogenic effects. Both strains induced the expression of Iba1, CD68 activation markers, whereas MHC-II expression was induced only by ZIKV<sub>MR766</sub>. ZIKV infection has been shown to produce differential expression of miRNAs 155, 146a, 132 and 125b, as well as their respective cellular targets involved in the regulation of the innate immune response. ZIKV<sub>MR766</sub> infection showed higher levels of miRNAs than that caused by ZIKV<sub>PE243</sub>, especially miR-146a in 24h (> 7 folds). Also, both strains have been shown to prompt a differential pattern in the expression of pro and anti-inflammatory cytokines, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and IL-10.

We expect that the observed differences between the two ZIKV strains will help us, at a later stage, to clarify the molecular mechanisms involved in the disease or protection, virulence, tissue tropism, pathology, and immune evasion.

**Key words:** Zika virus, microRNA, microglia, immune response, neuroinflammation.

## 1. Introdução

### 1.1. O vírus da Zika

#### 1.1.1. Epidemiologia: histórico da doença

Nos últimos anos, o surgimento, ou ressurgimento, de diferentes arboviroses gerou um alerta global de saúde. A exemplo do vírus Zika (ZIKV), que foi identificado pela primeira vez em 1947 na Floresta Zika de Uganda durante uma intensa busca pelo vírus da febre amarela (YFV). Em 18 de abril daquele ano, a temperatura de um macaco Rhesus engaiolado (nº 766) foi de 39,7°C. No terceiro dia de febre, uma amostra de sangue foi coletada deste macaco e injetada por via intracerebral e intraperitoneal em camundongos Swiss, e por via subcutânea em outro macaco Rhesus (nº 771). Todos os camundongos inoculados intracerebralmente mostraram sinais de doença 10 dias após a inoculação, o macaco nº 766 não mostrou mais nenhuma anormalidade além da pirexia e o macaco nº 771 não mostrou qualquer anormalidade nem temperatura corporal elevada. O agente isolado do macaco nº 766 foi neutralizado e referido como ZIKV<sub>MR766</sub> (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O isolamento do vírus de um macaco Rhesus sentinela e de um *pool* de mosquitos *Aedes (Ae.) africanus* indicou que o Zika era essencialmente uma infecção silvestre transmitida de um hospedeiro animal para outro (G. W. A. DICK, 1952). Apesar de já em 1956, Boorman e Porterfield já terem constatado a suscetibilidade do *Aedes aegypt* urbano ao vírus e a potencialidade do mosquito de transmitir e espalhar a doença (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956), principalmente nas regiões onde os primatas estão indisponíveis para atuar como reservatórios primários da infecção e os humanos se tornariam os principais hospedeiros de amplificação (HOWARD, 2016).

Por muito tempo os seres humanos foram considerados hospedeiros incidentais (WEINBREN; WILLIAMS, 1958), acreditando que as primeiras infecções humanas relatadas foram por Macnamara em 1954 em um surto de icterícia na Nigéria (MACNAMARA, 1954) e por Bearcroft que inoculou o vírus em um voluntário (BEARCROFT, 1956). Porém, uma década depois, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) constatou que o vírus isolado por esses trabalhadores era próximo, se não idêntico, ao vírus Spondweni (CDC, 1985), e que o primeiro caso humano comprovado de infecção pelo vírus Zika foi relatado por Simpson em 1964 de um pesquisador que ficou doente durante uma coleta de *Ae. africanus* na floresta Zika em 1962-63 (SIMPSON, 1964).

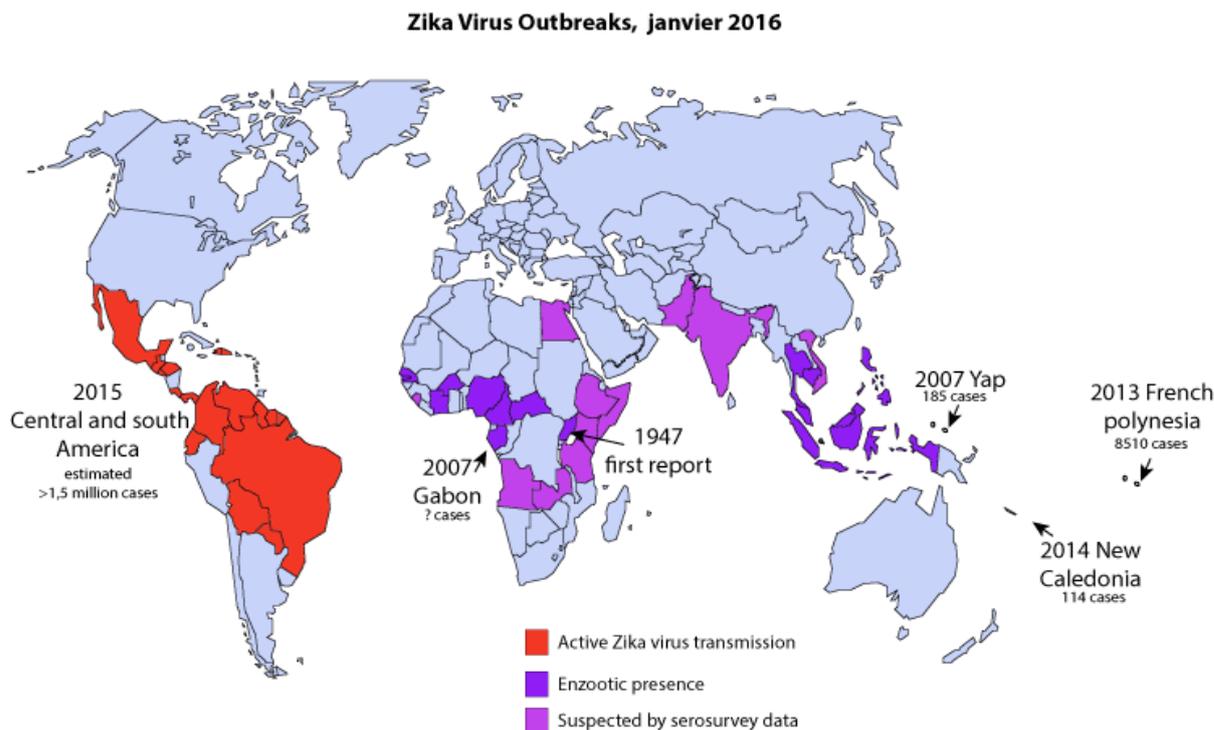
Assim, desde a sua descoberta até 2007, o vírus Zika permaneceu como um obscuro vírus transmitido por mosquitos, que se acreditava estar restrito a um estreito cinturão equatorial na África e na Ásia. Apenas quatorze casos esporádicos confirmados laboratorialmente foram relatados com quadro clínico clássico: exantema maculopapular pruriginoso, febre, conjuntivite, artralgia e, às vezes, cefaleia e mialgia. Até que o vírus se espalhou em uma grande epidemia na Ilha Yap nos Estados Federados da Micronésia, onde estima-se que 73% da população foi infectada (DUFFY et al., 2009). Além de se levar em conta que as manifestações clínicas são percebidas em somente cerca de 20% dos infectados e da doença ser, conseqüentemente, subnotificada (LANCIOTTI et al., 2008).

O que se sabia até então era que o ZIKV era um arbovírus (*arthropod borne virus*) pertencente ao gênero Flavivírus da família *Flaviviridae*, assim como o vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), entre outros (FAGBAMI, 1979), e que se encontrava na natureza mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos (HAYES, 2009). Até que entre outubro de 2013 e abril de 2014, uma nova epidemia atingiu a Polinésia Francesa, de onde vieram as primeiras indicações do envolvimento neural descrevendo a síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos e outras complicações neurológicas (CAO-LORMEAU et al., 2016). A GBS é caracterizada por neuropatias periféricas mediadas por mecanismos imunológicos que se manifestam geralmente com uma paralisia motora simétrica com ou sem envolvimento sensorial e autonômico (OEHLER et al., 2014), já reportada em outras arboviroses como WNV (LEIS; STOKIC, 2012), JEV (RAVI et al., 1994), DENV (MISRA et al., 2006) e Chikungunya vírus (CHIKV, *Togaviridae*) (LEBRUN et al., 2009). ZIKV também foi isolado do sêmen de um paciente (MUSSO et al., 2015), confirmando a transmissão não-vetorial, provavelmente sexual, observada em 2011 nos Estados Unidos da América (EUA) (FOY et al., 2011). No entanto, a maior preocupação foi com o aumento da incidência de microcefalia entre os recém-nascidos no Brasil em 2015 em relação ao passado, com a possível capacidade do ZIKV ser transmitido por via transplacentária. A microcefalia é uma doença que envolve proliferação prejudicada e morte de progenitores corticais no cérebro, que pode levar a graus variados de retardo mental (CHEN, 2018). Em abril de 2016, foi constatada a presença do ZIKV no cérebro de fetos (MLAKAR et al., 2016) e no líquido cefalorraquidiano de adultos (CARTEAUX et al., 2016). O surgimento da microcefalia e de outras desordens neurológicas fez da neuropatia do ZIKV um foco de atenção em todo o mundo.

Foi sugerido que o ZIKV foi apresentado ao Brasil pela primeira vez durante a Copa do Mundo de futebol de 2014 (ZANLUCA et al., 2015), porém equipes de países com circulação contínua do ZIKV não participaram da competição. Neste mesmo ano, no entanto, o Brasil também sediou o Campeonato Mundial de Canoagem de Primavera no Rio de Janeiro, com a participação de quatro países do Pacífico em que o ZIKV estava circulando: Polinésia Francesa, Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015), Ilhas Cook (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014) e Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2016). Estudos filogenéticos sugerem que o ZIKV pode ter sido introduzido no Brasil durante este evento esportivo (BARONTI et al., 2014; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015).

Em seguida, outros países da América relataram a transmissão do vírus sendo que, até final de 2016, setenta e seis países e territórios no mundo confirmaram transmissão vetorial, o que são mais de 1,5 milhão de casos suspeitos como mostrado na Figura 1. Essa disseminação sem precedentes, combinada com as condições neurológicas associadas, resultaram com a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarando uma emergência de saúde pública global em fevereiro de 2016 (WHO, 2017).

Na América Latina, o *Aedes (Stegomyia) aegypti* e o *Aedes (Stegomyia) albopictus* são amplamente distribuídos e muito numerosos (PETERSEN et al., 2016). Como em outros continentes, o rápido crescimento populacional humano e a urbanização descontrolada tornaram muito difícil reduzir as populações de mosquitos a níveis seguros. O ZIKV tem como principal vetor o *Ae. Aegypti*, porém é apenas mais um vírus à lista de arbovírus transmitidos pelas espécies deste subgênero, as quais se adaptaram bem a ambientes urbanos (MARCONDES; XIMENES, 2015). O subgênero *Stegomyia* inclui 128 espécies, que dentre elas *Ae. luteocephalus* (FAGBAMI, 1979), *Ae. vitattus* (DIAGNE et al., 2015), *Ae. furcifer* (HAYES, 2009), *Ae. hensilii* (LEDERMANN et al., 2014) e *Aedes apicoargenteus* (MCCRAE; KIRYA, 1982) já foram vetores da transmissão do ZIKV. O ZIKV também foi isolado de pools de várias outras espécies de mosquitos como *Culex perfuscus*, *Mansonia uniformis*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles coustani* (MARCONDES; XIMENES, 2015).



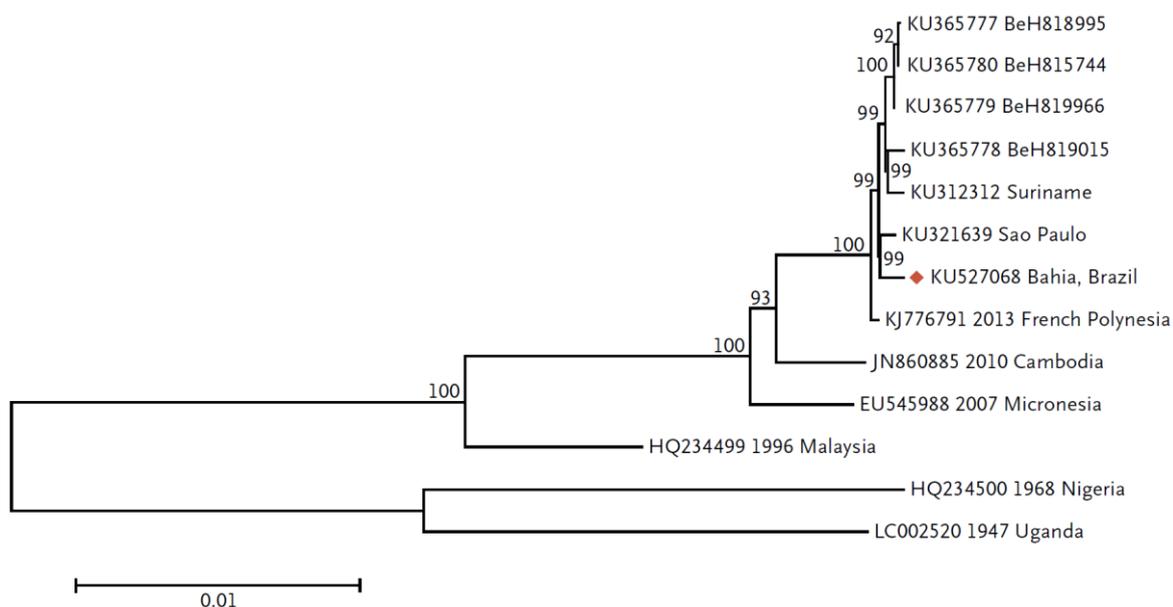
**Figura 1. Surto de Zika vírus, janeiro 2016.** Países e territórios mostrando a linha histórica do tempo de propagação do vírus Zika (1947 - 2015). O vírus Zika não está necessariamente presente em todo o país/território sombreado neste mapa. Países em vermelho estão com transmissão ativa do ZIKV; em roxo, possuem presença enzootica, infecção silvestre; e em rosa, têm suspeita por dados sorológicos. **Modificado de SIB, 2016.**

Nos últimos anos, esses mosquitos foram introduzidos em novas áreas, como nas Américas (*Ae. Aegypti* e *Ae. Albopictus*) (FAUCI; MORENS, 2016) e Europa (*Ae. albopictus*), sendo implicados como vetores de vários arbovírus (JULIANO; LOUNIBOS, 2005). O *Ae. aegypti* parece raramente invadir ambientes silvestres e tem sido implicado como vetor do CHIKV (MORENS; FAUCI, 2014), DENV e do vírus Mayaro em ambientes urbanos (VIEIRA et al., 2015). Ocasionalmente, o *Ae. aegypti* foi encontrado infectado com o WNV no Brasil na última década (MELANDRI et al., 2012), cujo principal vetor é o mosquito da espécie *Culex* (GRANWEHR et al., 2004). Também tem servido como vetor urbano do YFV, que tinha sido considerado erradicado de contextos urbanos no Brasil desde 1942 (FIGUEIREDO et al., 2018). No Distrito Federal, apenas 6 casos de ZIKV foram confirmados por reação em cadeia de polimerase (PCR) entre 2017 e 2019 (SESDF, 2019).

### 1.1.2 Classificação filogenética

A análise filogenética da sequência parcial do ZIKV revelou que os isolados virais podem ser categorizados em cepas africanas e asiática, em que a cepa africana é subdividida em estirpes nigerianas e MR766 (FAYE et al., 2011). Estudos genéticos sobre o gene da proteína não estrutural 5 (NS5) indicam que o ZIKV foi provavelmente originário da África Oriental e se espalhou em direção à África Ocidental e Ásia a aproximadamente 50-100 anos atrás (FAYE et al., 2014).

Um vírus foi isolado em Recife - Brasil em 2015 de um paciente com erupção na face e membros; artralgia das mãos, punho e tornozelo; edema nas mãos e punho; e sem sintomas neurológicos. Foi completamente sequenciado e relatado como *ZIKV/Homo sapiens/Brasil/PE243/2015* (abreviado para ZIKV<sub>PE243</sub>) (DONALD et al., 2016). Os dados das sequências obtidas da epidemia do Brasil confirmaram que são derivados da cepa asiática e estão mais relacionados à linhagem do surto da Polinésia Francesa em 2013, como demonstra a Figura 2 (MUSSO, 2015).



**Figura 2. Análise filogenética do genoma completo do vírus Zika.** O número de acesso do GenBank, ano de isolamento e país de origem são indicados nas filiais do ZIKV para todos os isolados, exceto para os identificados em 2015 e 2016. A barra de escala 0,01 indica a distância genética nas substituições de nucleotídeos por sítio. Na poliproteína do ZIKV Bahia, Brasil, 23 polimorfismos foram detectados em comparação com a estirpe da Micronésia e 5 polimorfismos em comparação com o isolado da Polinésia Francesa. **Adaptado de Mlakar et al., 2016.**

Os vírus da cepa africana foram esporadicamente associados à infecção humana ao longo do século passado, enquanto os da cepa asiática surgiram como um novo ônus para a saúde pública devido à sua capacidade de transmitir de humano para humano e causar anormalidades neurológicas (HADDOW et al., 2012). Alterações genéticas entre as linhagens do ZIKV são atribuídas à disseminação global de novos fenótipos e ao surgimento de neuropatogenicidade aumentada. Análise filogenética e de variante de aminoácidos dos isolados de estirpes espacialmente diferentes do ZIKV - MR766 (Uganda, 1947), P6-740 (Malásia, 1966), DAKAR 41519 (Senegal, 1984), FSS13025 (Camboja, 2010) e PRVABC 59 (Porto Rico, 2015) - revelaram distintas origens filogenéticas e diferenças significativas de aminoácidos na poliproteína viral. Níveis mais elevados de alterações acumuladas foram relatados na proteína do envelope, na região terminal da pré-membrana (prM), na NS2A e nas regiões da proteína NS5 dos genomas do ZIKV (TRIPATHI et al., 2017).

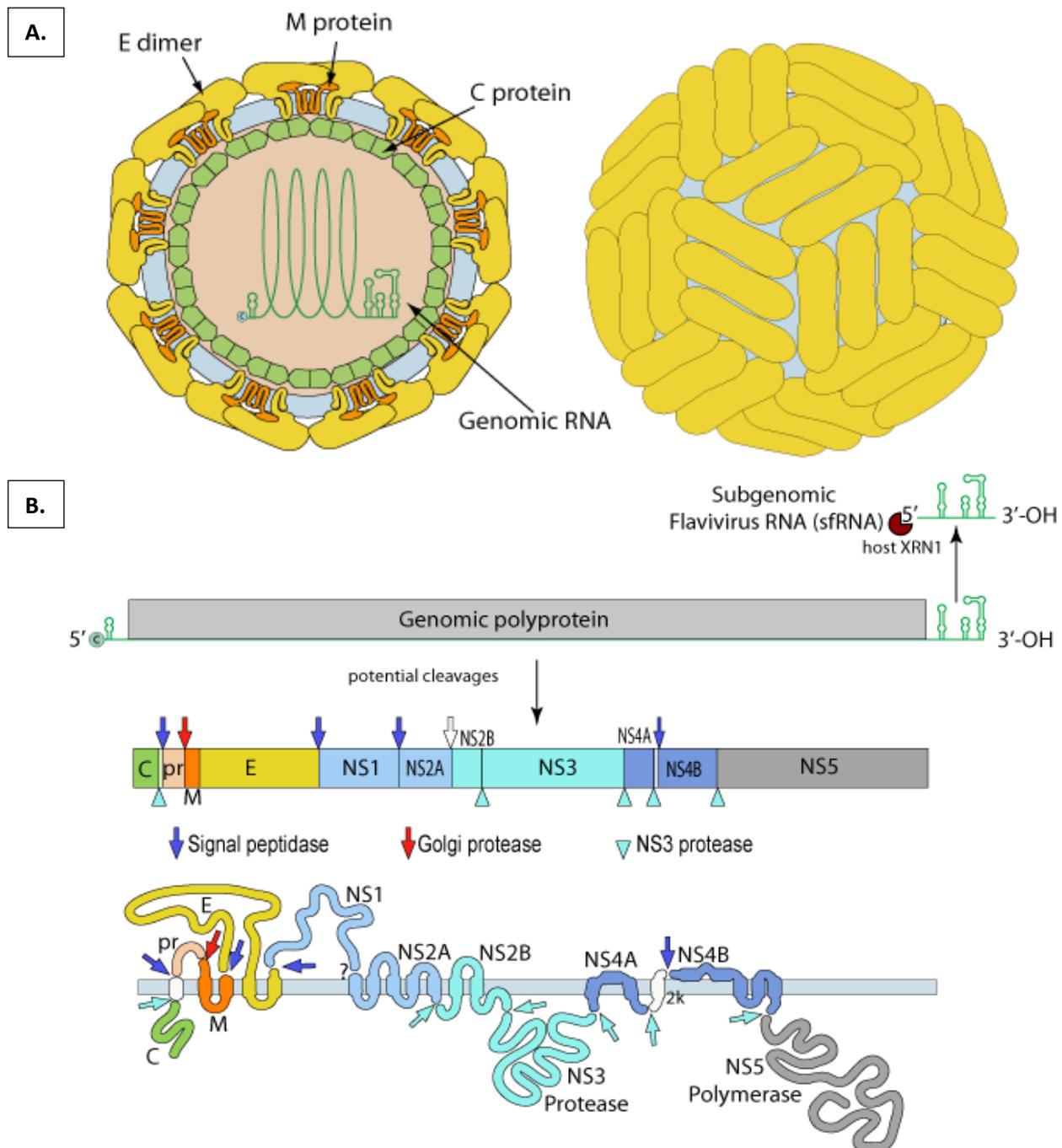
Entretanto não há explicações virológicas óbvias, baseadas na análise de sequências, para o aumento da ocorrência de casos de doenças neurológicas associadas ao surto no Brasil. Não foram encontradas mutações específicas no genoma viral associadas a casos graves (FARIA et al., 2016). Apesar das regiões não traduzidas (UTR) estarem amplamente ausentes em muitos sequenciamentos de isolados das Américas e dessa informação ser importante, dada a relevância dessas regiões genômicas não-codificadoras na tradução, replicação e patogênese do vírus. A 5'UTR do ZIKV é amplamente conservada entre isolados da mesma cepa e tem aproximadamente 107 nucleotídeos (nt) em isolados da cepa asiática, semelhante ao comprimento da cepa africana. Da mesma forma, existem poucas diferenças entre os 3'UTRs conhecidos em isolados asiáticos e africanos. Donald e colaboradores encontraram forte similaridade entre os isolados ZIKV<sub>PE243</sub> e Natal RGN, sendo este último a sequência completa de um isolado brasileiro associado à microcefalia, enquanto a primeira é associada a sintomas clássicos (DONALD et al., 2016).

Apesar das grandes epidemias terem sido causadas pelo vírus da cepa asiática, estudos sugerem que a cepa africana seja mais virulenta. Tripathi et al. observaram que os ZIKV da cepa africana induzem episódios curtos de sintomas neurológicos graves, seguidos de letalidade. Em comparação, os vírus da cepa asiática provocam sinais prolongados de disfunções neuronais, ocasionalmente causando a morte de camundongos STAT2<sup>-/-</sup> (nocaute). O ZIKV<sup>AF</sup> gera níveis mais altos de citocinas e marcadores inflamatórios associados à infiltração celular no cérebro de camundongos infectados, o que pode explicar a patogênese exacerbada em comparação com a cepa asiática (TRIPATHI et al., 2017).

### 1.1.3 Estrutura e Genoma

Semelhante a outros Flavivírus, o genoma do ZIKV é uma fita simples de RNA de senso positivo (ssRNA +) com cerca de 11 kb de comprimento e contém uma única fase de leitura aberta (ORF), flanqueada por regiões não codificadoras nos lados 5' e 3'. A extremidade 5' do genoma possui um *cap* de nucleotídeo metilado para tradução celular e o terminal 3' não é poliadenilado, mas forma uma estrutura em *loop*. A ORF codifica uma poliproteína que é clivada por proteases hospedeira e viral em capsídeo (C), precursor de membrana (prM), envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) como ilustra a Figura 3 (HEMERT; BERKHOUT, 2016). Muitas cópias da proteína C envolvem a fita simples de RNA formando o nucleocapsídeo, que é responsável pelo reconhecimento e montagem do RNA viral (FRANCOLINI et al., 2018). A proteína prM (gp23) tipicamente se associa com E para formar heterodímeros que são ancorados na bicamada lipídica derivada do hospedeiro através de seus domínios transmembrana e é importante para o dobramento apropriado do envelope (XUE et al., 2018). A glicoproteína do envelope é altamente conservada e composta por noventa dímeros dispostos em uma simetria quase icosaédrica que cobre completamente a superfície viral, a qual medeia a ligação, entrada e fusão às células hospedeiras dos mosquitos e dos mamíferos e é o alvo principal dos anticorpos neutralizantes (DAI et al., 2016). Além de controlar a tradução e replicação viral, as proteínas NS estão envolvidas na patogênese e na atenuação das respostas antivirais do hospedeiro (XUE et al., 2018).

A glicoproteína NS1 (gp46) existe como um homodímero associado à membrana (mNS1), após translocação para o lúmen do RE, e é necessária durante a replicação do genoma viral e maturação do vírion (SHI; GAO, 2017). Células infectadas secretam NS1 (sNS1) no espaço extracelular como uma partícula de lipoproteína hexamérica (XU et al., 2016). A lipoproteína da sNS1 pode provocar não apenas anticorpos protetores, mas também autoanticorpos que contribuem para a síndrome do choque da dengue (DSS). Além disso, a sNS1 está envolvida na patogênese pela ativação de células da imunidade inata (levando à DSS), interação com diferentes componentes do sistema do complemento e pelo envolvimento na evasão da resposta imune. NS1 também representa o principal marcador antigênico para infecção viral (YOUNG et al., 2000). A proteína NS1 de vários flavivírus demonstrou conferir proteção contra a infecção em modelos animais na ausência de anticorpos neutralizantes detectáveis. No entanto, se a imunização com a proteína NS1 de ZIKV tem capacidade de proteção semelhante, é atualmente desconhecida (EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014).



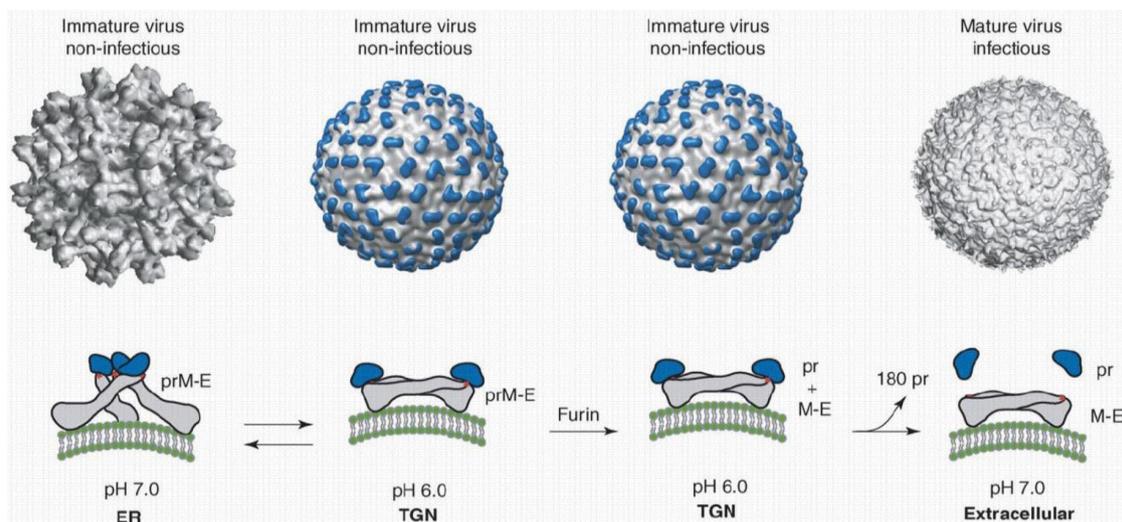
**Figura 3. Estrutura do vírion e composição do genoma viral do Zika.** **A.** Vírion: envelopado, esférico, com cerca de 50 nm de diâmetro. As proteínas de superfície estão dispostas em uma simetria semelhante à icosaédrica. **B.** Genoma: monopartido, linear, ssRNA<sup>+</sup> de 10.794 bases. A extremidade 5' do genoma possui um *cap* de nucleotídeo metilado para tradução celular. O terminal 3' não é poliadenilado, mas forma uma estrutura em *loop*. Esta estrutura secundária leva à formação de um sfRNA através da degradação incompleta do RNA genômico pela XRN1 do hospedeiro. O sfRNA é essencial para a patogenicidade e pode desempenhar um papel importante na inibição da atividade antiviral do RIG-I do hospedeiro, um receptor de reconhecimento de padrão. O RNA do vírion é infeccioso e serve tanto como genoma quanto como RNA mensageiro viral. O genoma é traduzido em uma poliproteína de 3.419 aminoácidos de comprimento, que é processada co e pós-traducionalmente por proteases hospedeira e viral. **Adaptado de SIB, 2016.**

Por outro lado, as NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas de membrana hidrofóbicas necessárias para a montagem do vírus e desempenham um papel importante na inibição da resposta do interferon (IFN). NS3 e NS5 possuem diferentes atividades enzimáticas: a proteína NS3 codifica a serina protease viral (ativa apenas com o cofator NS2B), helicase, nucleosídeo trifosfatase e RNA trifosfatase; a NS5 é a maior e mais conservada proteína viral, codifica uma metiltransferase no N-terminal, enquanto o C-terminal codifica o RNA polimerase dependente de RNA. Uma pesquisa identificou um inibidor de protease do ZIKV *in vitro*, propondo que a combinação de bromocriptina e IFN poderia ser um tratamento para a infecção pelo ZIKV (CHAN et al., 2017; DUAN et al., 2017; LEI et al., 2016).

Mostrou-se que as 5' e 3' UTRs dos genomas de flavivírus possuem estruturas secundárias conservadas e são importantes para a ligação a várias proteínas do hospedeiro, além de proteínas envolvidas em complexos de replicação viral, tradução, estabilização do genoma e empacotamento de RNA (BRINTON; BASU, 2015). Além disso, a 3' UTR expressa RNA subgenômico de flavivírus (sfRNA), que é produzido pela degradação incompleta do RNA viral por uma 5'-3' exoribonuclease 1 (XRN1) celular devido a estruturas de *loop* de haste do RNA e pseudo-nós nessa região (PIJLMAN et al., 2008). Estas moléculas demonstraram ser mais do que um subproduto, pois estão envolvidas na patogênese e na interferência viral de respostas imunes inatas, tanto em vertebrados como em invertebrados, através da antagonização do IFN tipo I e de respostas de RNA de interferência (RNAi) (KHROMYKH et al., 2012). Estruturas secundárias, específicas para 3'UTRs de flavivírus, foram encontradas no ZIKV<sub>PE243</sub> assim como nos vírus da encefalite Murray Valley, YFV, DENV, JEV e vírus Kunjin. Também foram realizadas análises para comparar as sequências 3'UTR entre o ZIKV<sub>PE243</sub> e três isolados africanos, as quais sugerem que as diferenças sequenciais entre estes isolados asiático e africanos não afetam, ou são improváveis que afetem, a estrutura predita do sfRNA (DONALD et al., 2016).

Um estudo demonstrou que uma única substituição de serina por asparagina (S139N) na proteína de membrana (prM), detectada em linhagens contemporâneas do ZIKV da cepa asiática, aumentou substancialmente a infectividade em células progenitoras neurais (NPCs) humanas e levou a maior neurovirulência em camundongos neonatais em relação a linhagens ancestrais da mesma cepa. Já a substituição reversa, N139S, do vírus parental diminuiu significativamente a mortalidade causada pelo vírus em fetos de camundongos (YUAN et al., 2017). A co-expressão de prM e E de vários flavivírus resulta na secreção de

partículas semelhantes a vírus (VLPs) denominadas partículas subvirais recombinantes. A proteína prM sofre um evento de clivagem durante a maturação do vírus como na Figura 4. Portanto, as proteínas prM e E têm sido os principais alvos para o desenho racional de vacinas recombinantes (BOIGARD et al., 2017).



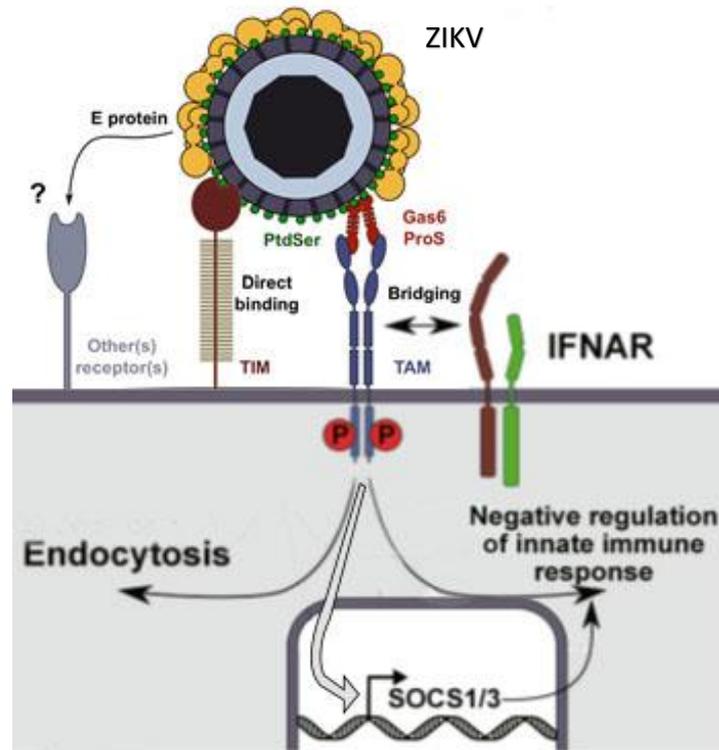
**Figura 4. Clivagem de prM durante a maturação do vírus.** Vírions imaturos/não infecciosos são formados no retículo endoplasmático (ER), onde a proteína E se liga com o prM. Em condições de pH ácido, 3 heterodímeros prM-E dissociam-se e reorganizam-se para formar uma protrusão trimérica com as alças de fusão inserindo-se na membrana endossômica. Este movimento puxará as membranas do vírus. 60 heterodímeros prM-E triméricos entram na rede trans-Golgi (TGN). Durante a maturação do vírion, o peptídeo pr é clivado da proteína M intracelularmente por protease do tipo Furina. Quando o vírion é liberado no espaço extracelular em condição de pH neutro, o pr é dissociado. Nessa circunstância, as protrusões triméricas de prM-E são rearranjadas para formar 90 homodímeros de E, gerando a superfície lisa no vírion maduro/infeccioso. No entanto, este processo é sempre ineficiente, e o vírus geralmente contém prM sem cortes. A extensão da clivagem de prM necessária para a transição de partícula não infecciosa para infecciosa é desconhecida. A presença de prM influencia a interação de vírions e anticorpos. **Adaptado de Kuhn, 2015.**

Comparações entre as sequências e as estruturas da proteína E do ZIKV com outros flavivírus mostram que partes dessa proteína se assemelham aos neurovirulentos WNV e JEV, enquanto outras partes são semelhantes ao DENV. Observou-se que a partícula do vírus é estruturalmente estável mesmo quando incubada a 40°C, em contraste acentuado com o DENV menos estável termicamente, o que se reflete na infectividade em diferentes temperaturas (KOSTYUCHENKO et al., 2016, 2013). A microscopia crioeletrônica mostra um vírus com uma superfície mais compacta. Esta estabilidade estrutural do vírus pode ajudá-lo a sobreviver nas difíceis condições do sêmen, saliva e urina, por exemplo (MANSUY et al., 2016; BRUGNARO et al., 2016; GOURINAT et al., 2015). Anticorpos ou drogas que desestabilizam a estrutura podem ajudar a reduzir o resultado da doença ou limitar a disseminação do vírus.

### 1.1.4 Replicação viral

Assim como outros flavivírus, a replicação do genoma do ZIKV ocorre em complexos de replicação associados à membrana do retículo endoplasmático (ER). Para isto, são explorados maquinários celulares para formação de vesículas, uma vez que os vírus são limitados em seu tamanho genômico e não possuem a capacidade de codificar todas essas funções. Assim, eles têm que desenvolver estratégias para explorar as vias hospedeiras envolvidas na síntese lipídica e proteica (CANN, 2005). Os vírus de RNA de cadeia positiva replicam-se no citoplasma de células infectadas e induzem a formação de compartimentos membranares intracelulares para abrigar os locais de síntese de RNA viral. Essas fábricas de replicação devem concentrar os componentes da replicase e proteger os intermediários da defesa imunológica inata da célula hospedeira (HARAK; LOHMANN, 2015).

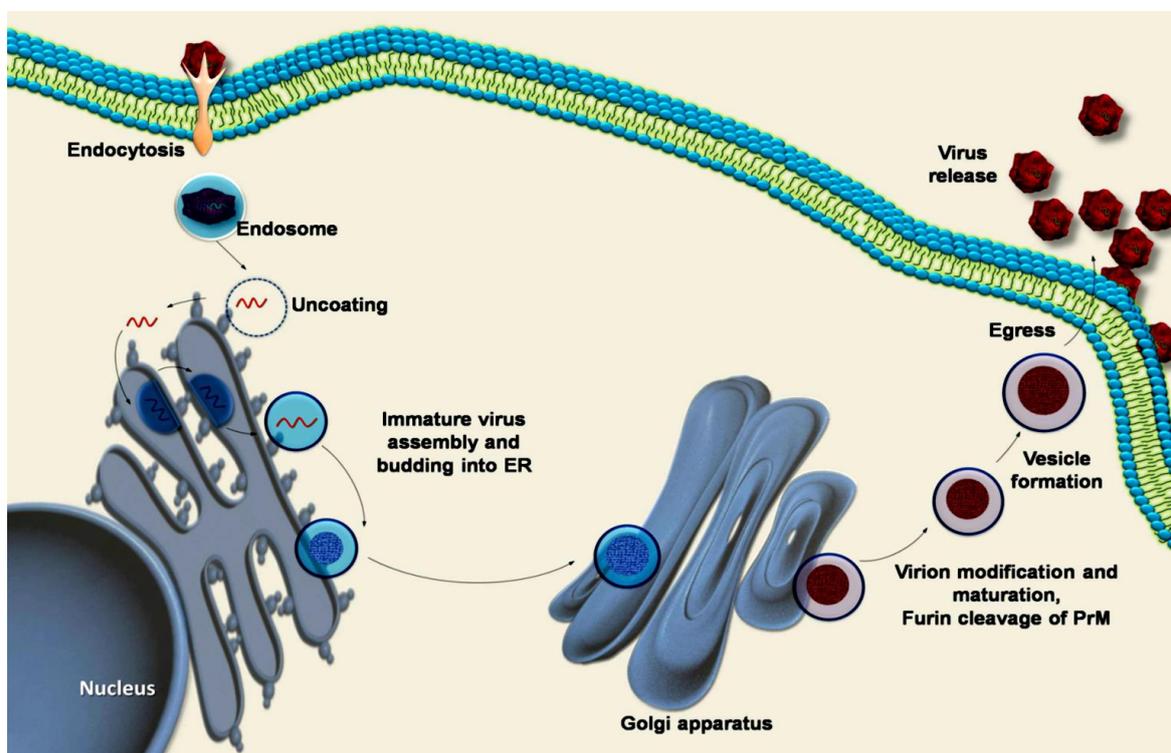
O ZIKV interage com a membrana endossômica da célula hospedeira através da glicoproteína E com os receptores da superfície celular para iniciar a endocitose mediada por clatrina, uma proteína que ajuda na biogênese e endereçamento de vesículas (PERERA-LECOIN et al., 2014). Foi demonstrado que o ZIKV é capaz de infectar células utilizando os fatores de adesão DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), TIM 1 e 4 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin domain*), Tyro3, Axl e Mer (TAM, receptores de tirosina quinase) (HAMEL et al., 2015). A entrada do ZIKV mediada por TAM requer o ligante Gas6 (*Growth-arrest-specific 6*) e ProS (proteína S dependente de vitamina K), que reconhece fosfatidilserina (PtdSer) exposta na superfície do envelope viral e liga as partículas do vírus às células (MEERTENS et al., 2017). Por outro lado, os receptores TAM desempenham um duplo papel durante a infecção por flavivírus. Na entrada, os receptores TAM capturam os complexos vírus-Gas6/ProS e melhoram a internalização de vírus através de mecanismos ainda desconhecidos. Paralelamente, esses complexos também ativam os receptores TAM, que recrutam o receptor de interferon (IFNAR) para induzir a expressão do supressor da sinalização de citocinas (SOCS) 1/3, inibindo assim as respostas antivirais inatas e facilitando a replicação, como na Figura 5 (PERERA-LECOIN et al., 2014).



**Figura 5. Adesão do ZIKV ao hospedeiro e o papel dual dos receptores TAM.** Modelo proposto de reconhecimento direto de ZIKV pelos receptores TIM. Já as proteínas TAM se ligam indiretamente à PtdSer viral através de seus ligantes naturais Gas6 e ProS, que agem como moléculas ponte. Além de melhorar a internalização do vírus, em paralelo, a ativação dos receptores TAM recruta o receptor de interferon (IFNAR) para induzir a expressão de SOCS1/3, inibindo assim as respostas antivirais inatas. **Modificado de Meertens et al., 2012 e Perera-Lecoin et al., 2014.**

Após a ligação ao receptor, o ZIKV é internalizado por mimetismo apoptótico através de endocitose mediada por clatrina e trafega por endossomos para estabelecer uma infecção produtiva (MEERTENS et al., 2017). No citoplasma, o ambiente ácido do endossomo induz as partículas do vírus a se desmontarem, o que resulta na fusão das membranas viral e celular, e o RNA genômico é liberado. Posteriormente, o RNA é traduzido em uma poliproteína, que é clivada em proteínas não estruturais e estruturais, para produzir as proteínas envolvidas na replicação e formação do nucleocapsídeo. A replicação do genoma viral ocorre na superfície do ER em fábricas virais citoplasmáticas e começa a produzir RNAs de cadeia dupla a partir do genoma de RNA de cadeia única positiva, que é seguido por transcrição e replicação para fornecer mais mRNAs e novos genomas ssRNA+. A montagem do vírus ocorre no ER e o nucleocapsídeo, por sua vez, é envolvido por uma membrana derivada do hospedeiro modificada com duas glicoproteínas virais (prM e E) para se reunir em vírions prematuros que brotam do lúmen. Através do processamento no complexo de Golgi, os vírus maduros são produzidos pela clivagem mediada por furina da proteína prM e liberados por exocitose para a próxima rodada de infecção, como ilustrado na Figura 6 (NEAL, 2014).

Estudos sugeriram que o receptor de superfície celular Axl funcionaria como o receptor primário para a entrada do ZIKV em células precursoras neurais (NSCs), células da glia radiais, astrócitos e microglia, por ser altamente expresso nestas (NOWAKOWSKI et al., 2016; TABATA et al., 2016; SHERIDAN et al., 2017). Porém, Li e colaboradores demonstraram que a deleção do AXL não reduzia a replicação do ZIKV em cérebros de camundongos, indicando que o AXL não desempenha um papel essencial na infecção pelo Zika em cérebros de camundongos (LI et al., 2017).



**Figura 6. Ciclo de replicação viral.** O ZIKV entra na célula por meio de endocitose mediada por receptor. O ambiente ácido no endossomo induz a fusão viral liberando o RNA genômico. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é posteriormente processada por proteínas hospedeiras e codificadas por vírus. O complexo de replicação de flavivírus é montado próximo à membrana do ER. Após a replicação viral, a embalagem ocorre na superfície do ER e os vírions imaturos resultantes são translocados para o complexo de Golgi, onde a clivagem mediada por furina de prM para M gera vírus maduros que são liberados via exocitose. **Adaptado de Saxena et al., 2016.**

### **1.1.5 Resposta Imune**

Logo após a entrada do vírus, o hospedeiro desencadeia uma rede de defesa integrada, composta de fatores envolvidos nas respostas imune inata e adaptativa. O vírus se replica na área da inoculação, em células dendríticas (CD) locais e nos macrófagos, os quais transportam o vírus para os linfonodos e outros tecidos linfoides para iniciar uma resposta imune adaptativa. Posteriormente nos tecidos linfoides, ocorre o recrutamento de monócitos que disseminam o vírus pela corrente sanguínea e o espalha para tecidos pelos quais tem tropismo. Durante este período de incubação silencioso, a carga viral na circulação aumenta rapidamente para atingir níveis séricos elevados de partículas infecciosas (HAMEL et al., 2015).

A entrada e replicação de flavivírus acionam a resposta imunitária do hospedeiro, estimulando a produção de IFN tipo I. Concomitante a isso, o trauma associado à picada do mosquito, que é seu principal transmissor, e à presença de proteínas salivares induzem um recrutamento de vários tipos celulares, como mastócitos e neutrófilos. A degranulação de mastócitos e a expressão de altos níveis da citocina pró-inflamatória interleucina-1 (IL-1), desempenham um importante papel na indução de resposta inflamatória (PINGEN et al., 2016, 2017). É importante, no entanto, ressaltar que os resultados obtidos a partir da análise de citocinas em pacientes com infecção por arbovírus são frequentemente contraditórias. Assim, para a mesma infecção viral, as discrepâncias entre os estudos podem refletir diferentes origens genéticas, condições sanitárias heterogêneas, estratégias de manejo do paciente ou diferenças nas técnicas laboratoriais (PETITDEMANGE et al, 2014; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

#### **1.1.5.1. Resposta Imune Inata**

Estudos iniciais mostraram que, em certos casos, as proteínas virais são o gatilho da resposta imune inata, porém, que os ativadores mais predominantes são os ácidos nucleicos. Estes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são detectados por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes na superfície celular ou em compartimentos intracelulares. Entre eles incluem os receptores Toll-like (TLRs), os receptores semelhantes à RIG (RLRs), os receptores semelhantes a NOD (NLRs) e sensores de DNA citosólico (KAWAI; AKIRA, 2010; MEYLAN; TSCHOPP; KARIN, 2006).

Sabe-se que a resposta do IFN do hospedeiro é essencial para combater infecções virais e prevenir a replicação do vírus (CASTILLO RAMIREZ; URCUQUI-INCHIMA, 2015). A resposta imune inata contra os flavivírus é desencadeada pela detecção dos PAMPs através dos PRRs citosólicos RIG-I (gene induzível pelo ácido retinóico I) e MDA5 (proteína associada à diferenciação do melanoma 5), e TLR 7/8 ou TLR3 endossômicos, que sinalizam a indução da produção de IFN- $\alpha/\beta$  (JOGI et al., 2015). Isso foi especificamente ilustrado para o ZIKV, uma vez que estudos de patogênese *in vivo* requerem modelos murinos IFN tipo I<sup>-/-</sup> (LAZEAR et al., 2016). Enquanto o IFN tipo III mostrou ter um papel protetor contra a infecção por ZIKV em células placentárias humanas (BAYER et al., 2016).

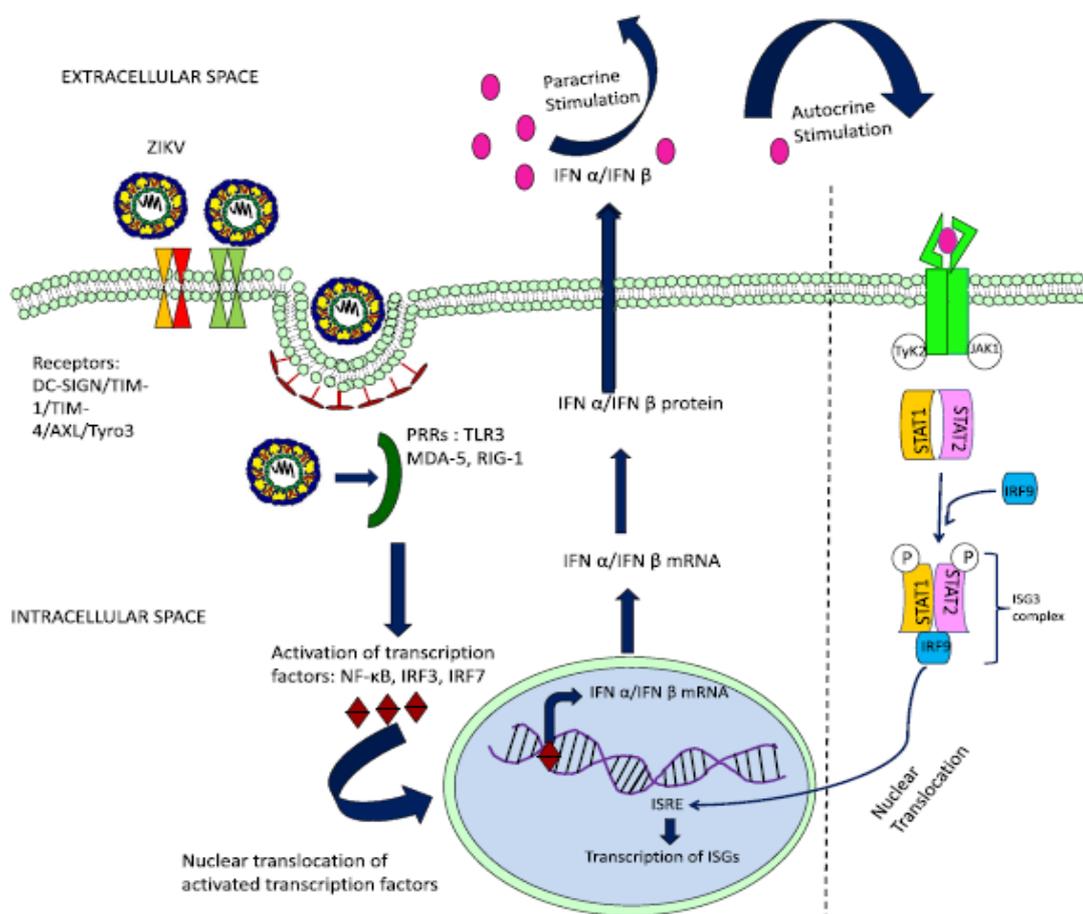
No entanto, os vírus empregam mecanismos que permitem contrabalançar as respostas de IFN do hospedeiro para replicar com eficiência, manipulam a sinalização de TLR para evitar respostas imunes ou até mesmo explorá-lo para seu próprio benefício. Ensaios usando indutores específicos dos componentes de indução de IFN tipo I, RIG-I e MDA-5, permitiram entender melhor o mecanismo de ação das moléculas de sfRNA do ZIKV. A estimulação de RIG-I resulta em uma diminuição significativa da atividade do promotor de IFN- $\beta$  na presença de sfRNA de DENV e ZIKV. Em contraste, a estimulação de MDA-5 não alterou a atividade do promotor de IFN- $\beta$  na presença de sfRNA de DENV, embora tenha sido observada uma diminuição fraca, mas significativa, em células que expressam sfRNA de ZIKV. Estes dados sugerem que tanto o ZIKV quanto o DENV antagonizam a indução de IFN tipo I mediada por RIG I. Apenas o sfRNA do ZIKV antagonizou a atividade do MDA-5 nestes ensaios, embora o significado biológico disto ainda não tenha sido esclarecido. A produção de sfRNA na infecção pelo ZIKV pode ser um importante fator para a patogênese associada (DONALD et al., 2016).

Após o reconhecimento do PAMP, a transdução de sinal através destes receptores pode ser iniciada pelo recrutamento de MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88) e fosforilação de IRAK1 (quinase 1 associada a IL-1R), a qual requer uma poliubiquitinação pelo TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF). A ativação de IRAK1 resulta na propagação da transcrição de genes dependentes do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), cujos produtos são necessários para iniciar uma resposta inflamatória (DUMBREPATIL et al., 2019). Outra possível via desencadeada pelo reconhecimento de PAMPs virais pelos TLRs é a que envolve a molécula adaptadora contendo o domínio TIR (TRIF - também conhecida como o domínio TIR contendo a molécula 1, TICAM1), que resulta na ativação do fator regulador de IFN 3 (IRF3), IRF7 e proteína ativadora 1 (AP-1) (THOMPSON et al., 2011). Essas vias

culminam na transcrição de citocinas pró inflamatórias, IFN tipo I, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e genes relacionados com a resposta imune inata (Figura 7) (BARBALAT et al., 2011; BARTON; KAGAN, 2009; KAWAI; AKIRA, 2011). Os IFNs tipo I são citocinas que se ligam ao IFNAR presente em quase todas as células, induzindo a via de sinalização Janus quinases (JAKs) e as vias de transdução de sinal e ativação da transcrição de proteína (STAT) 1 e STAT 2. Estas proteínas ativam a síntese de centenas de genes estimulados por IFN (ISGs), muitos dos quais conferem efeitos antivirais diretos, ao gerar um estado celular antagônico ao crescimento do vírus, enquanto outros facilitam e coordenam respostas imunes adaptativas (SCHOGGINS; RICE, 2011). Além disso, foi demonstrada a importância da resposta do IFN na modulação da infecção pelo ZIKV e no resultado da doença (BAYER et al., 2016; XIE; SHAN; SHI, 2016). No entanto, é crucial a existência de mecanismos para evitar a amplificação excessiva deste sinal. Um desses mecanismos é mediado por microRNAs induzidos por TLR (Figura 8). As proteínas SHIP1 (*Src homology 2-containing inositol 5'polyphosphatase 1*) e SOCS1 (Supressora de Sinalização de Citocinas) também regulam a via do NFκB inibindo a expressão de citocinas pró inflamatórias (THOUNAOJAM et al., 2014). Desta maneira, os próprios sinais induzidos por este receptor podem ajustar os níveis de resposta através da regulação de proteínas celulares (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011).

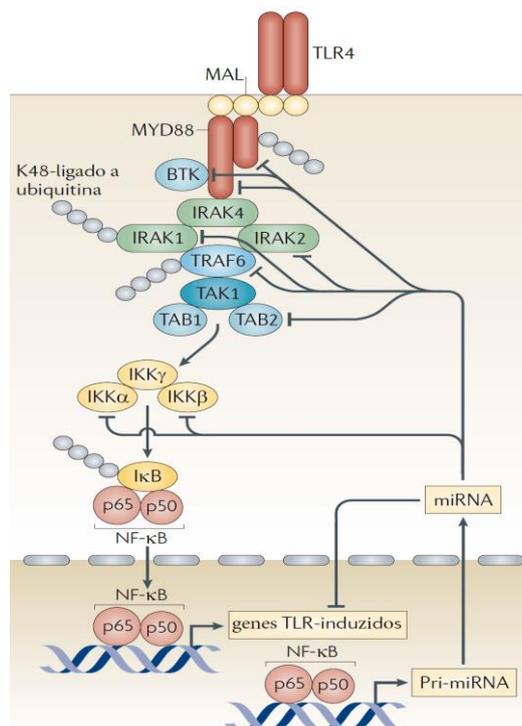
O sistema de IFN representa uma resposta antiviral compartilhada por todos os vertebrados, evolutivamente moldada por milênios através da exposição à uma grande variedade de patógenos (TENOEVEER, 2016). O resultado desta interação é uma resposta celular protetora, eficaz contra uma ampla gama filogenética de vírus potencialmente patogênicos (CASTILLO RAMIREZ; URCUQUI-INCHIMA, 2015). Por isso, a expressão dos TLRs é distinta em diferentes tipos de células. Sabe-se que macrófagos humanos expressam altos níveis de TLR2 e TLR4, enquanto as células dendríticas plasmocitóides (pCDs) expressam principalmente TLR7 e TLR9. Os TLRs são abundantemente expressos no sistema imune periférico, mas também estão presentes no sistema nervoso central (SNC), onde medeiam tanto as funções imunológicas quanto as respostas à lesão. Micróglias, as principais células imunes do SNC, expressam o repertório completo dos TLRs. Evidências experimentais sugerem que TLRs distintos regulam a plasticidade neural e o desenvolvimento em neurônios. Por exemplo, o TLR3 inibe a proliferação de células progenitoras neurais no telencéfalo do rato embrionário e regula o crescimento axonal. Uma maior expressão de TLR3 é observada em neurônios, astrócitos e micróglia, sugerindo uma

função específica em resposta aos vírus encefalitogênicos no SNC. Além disso, o TLR8 está envolvido na lesão e no desenvolvimento de neuritos associados ao desenvolvimento neural. Finalmente, TLR2 e TLR4 desempenham um papel na neurogênese adulta do hipocampo. O papel dos TLRs no desenvolvimento do cérebro e na morfogênese dos vertebrados além dessas configurações específicas é praticamente desconhecido. Embora existam ligantes endógenos de TLRs, incluindo proteínas da matriz extracelular e proteínas de choque térmico, as moléculas derivadas do hospedeiro que estimulam os TLRs no contexto do desenvolvimento do SNC permanecem não identificadas (MATSUMOTO; OSHIUMI;



**Figura 7. Resposta imune inata contra o vírus Zika.** O ZIKV entra nas células através da interação com receptores celulares como DC-SIGN/TIM-1/TIM-4/AXL/TYRO3, sendo endocitado através de mecanismos mediados por clatrina. Dentro da célula, o RNA viral é reconhecido por PRRs como TLR3/MDA-5/RIG-1. O reconhecimento viral estimula várias cinases, que, por sua vez, ativam os fatores de transcrição NF-κB, IRF3 e IRF7. Os fatores de transcrição ativados são translocados para o núcleo, levando à transcrição dos genes de IFN-I e a subsequente secreção de IFN-α e IFN-β. Os IFNs podem estimular a mesma célula (autócrina) ou células vizinhas (parácrina). Os IFN-I se ligam aos receptores de IFN (IFNAR) celulares, ativando a sinalização JAK-STAT, que leva à formação do complexo de genes estimulados por interferon 3 (ISG-3), composto por dímeros de STAT-1, STAT-2 fosforilados e fator regulador do IFN 9 (IRF9). Este complexo se transloca para o núcleo e se liga aos elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE) no DNA, levando à transcrição de ISGs que restringem a infecção e propagação viral nas células, contribuindo com um estado antiviral. Adaptado de Shaily; Upadhy, 2019.

SEYA, 2011; NAGYOSZI et al., 2010; ALEXOPOULOU; DESNUES; DEMARIA, 2012; EDWARDS et al., 2003; KAWAI; AKIRA, 2011; POTH et al., 2010; THOMPSON et al., 2011; VINCENT et al., 2011). Os padrões de expressão desses receptores também variam entre as espécies. Membros da família TLR em humanos são TLRs 1-10, enquanto no camundongo são TLR 1-9 e TLR 11-13. Os TLR 1/2/4/5/6/10 estão localizados extracelularmente, no qual o TLR4 é ativado por LPS, e os TLR 3/7/8/9 estão localizados dentro de endossomos no citoplasma, os quais reconhecem ácidos nucleicos produzidos durante infecções virais, em que o ssRNA é reconhecido pelos TLR 7/8 (JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2019). O TLR9, por exemplo, é restrito a poucos tipos de células em humanos, porém amplamente distribuído em camundongos. Neurônios do SNC de embriões e recém-nascidos de camundongo aumentam o TLR7 transitoriamente em torno do nascimento. Em contraste, a expressão de TLR9 aumenta constantemente durante a fase embrionária tardia e pós-natal até a neurogênese adulta do hipocampo (KAUL et al., 2012). Além disso, as pCDs são únicas, pois expressam constitutivamente o fator de transcrição IRF7, permitindo a produção rápida de altos níveis de IFN do tipo I em resposta à infecção viral, enquanto outros tipos celulares, como macrófagos, podem responder de maneira mais tardia. Dessa forma, a resposta à PAMPs virais idênticos pode diferir entre os tipos celulares, tanto na natureza das moléculas efetoras produzidas, quanto na cinética da resposta. Proteínas codificadas por vírus, que subvertem ou distorcem a resposta TLR, complicam ainda mais esse quadro (COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2004; HONDA et al., 2005).



**Figura 8. Os microRNAs funcionam em conjunto com outros mecanismos para controlar a expressão dos componentes de sinalização TLR.** A via de sinalização canônica de TLR4 utiliza a proteína MyD88 e MAL para propagar a transcrição do gene dependente de NF- $\kappa$ B. No entanto, é crucial que exista mecanismos para mudar este caminho para evitar a amplificação excessiva deste sinal. Um desses mecanismos é mediado por miRNAs induzidos por TLR, vários dos quais são regulados por NF- $\kappa$ B. Os miRNAs inibem a síntese de produtos gênicos, tais como citocinas e componentes das vias de sinalização de TLR. As moléculas de sinalização TLR que atualmente são conhecidas por serem alvos de miRNAs incluem MyD88, MAL, BTK, IRAK1, IRAK2, TRAF6, TAB2, I $\kappa$ B, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ . Desta maneira, os sinais induzidos por TLR podem adaptar os níveis de proteína na célula após a infecção. Pri-miRNA, microRNA primário. **Adaptado de O'Neill; Sheedy; McCoy, 2011.**

### 1.1.5.2. Resposta Imune Adaptativa

A resposta imune adaptativa também é essencial para restringir a replicação do ZIKV. A ação das células T é, principalmente, dirigida contra peptídeos imunodominantes das proteínas E, prM, NS3 e NS5, os quais são altamente conservados entre as cepas do vírus (ELONG NGONO et al., 2017). Contudo, as respostas humoral e celular não são igualmente importantes para a resistência à reinfecção. A indução de anticorpos anti-ZIKV é essencial para o controle viral, já que a transferência adotiva do soro imune, mas não esplenócitos imunes, foi capaz de salvar camundongos da infecção letal intracerebral do ZIKV (NAZERAI et al., 2018). Por outro lado, em situações em que o indivíduo já apresentou infecções prévias por flavivírus, seus anticorpos circulantes podem se ligar ao vírus com alta avidéz e estarem presentes em altas concentrações, podendo restringir a infecção pelo ZIKV. Entretanto, se os anticorpos presentes forem de baixa afinidade e estiverem em concentrações subneutralizantes, eles podem contribuir para um aumento da viremia por um fenômeno chamado aumento de infectividade dependente de anticorpos, conhecido como “pecado antigênico original” (NGONO; SHRESTA, 2018; VATTI et al., 2017).

Por outro lado, tem sido mais debatida a contribuição dos linfócitos T, particularmente das células LT-CD8<sup>+</sup>, na proteção e imunopatologia. Trabalhos com camundongos suprimidos de IFNAR sugerem um importante papel para estas células na infecção, enquanto estudos com camundongos adultos imunocompetentes sugerem que sua presença serve principalmente como um mecanismo de *backup*, quando os níveis de nAbs não são suficientemente elevados (ELONG NGONO et al., 2017; NAZERAI et al., 2018; WINKLER et al., 2017). Isto é apoiado por dados preliminares recentes que sugerem que, em camundongos com níveis apropriados de IFN tipo I, a atividade antiviral das células LT-CD8<sup>+</sup> é precoce, desde que estejam presentes em grande número. Em um estudo com

camundongos deficientes de IFN tipo I, as evidências indicam que as células LT-CD8<sup>+</sup> específicas contra o vírus não só contribuem para o controle viral mas também causam paralisia dos membros posteriores (JURADO et al., 2018). Por outro lado, as células LT-CD4<sup>+</sup>, dado o seu papel em respostas humorais adequadas, foram consideradas críticas para a proteção tanto em modelos de camundongos imunocompetentes, como de imunocomprometidos (HASSERT et al., 2018; LUCAS et al., 2018; NAZERAI; CHRISTENSEN; THOMSEN, 2019).

Durante as fases aguda e convalescente da infecção por ZIKV, níveis aumentados de citocinas relacionadas as respostas do tipo Th1, Th2, Th9, Th17 foram relatadas, sugerindo que é necessária uma resposta polifuncional das células T para a que o indivíduo se recupere da infecção (TAPPE et al., 2016). No entanto, uma imunoativação desequilibrada, com altos níveis de IL-6 e IL-8 no líquido cérebro-espinhal (CSF), tem sido associado à encefalomielite (GALLIEZ et al., 2016). Embora o principal papel seja desempenhado pela resposta humoral, foi recentemente sugerido que existe um envolvimento da resposta por células LT-CD8<sup>+</sup> na proteção contra a infecção por ZIKV, em um modelo de camundongo (ELONG NGONO et al., 2017; SAPPARAPU et al., 2016). Além disso, a ativação de células T e sua polarização para Th1 também tem sido demonstrada em camundongos (PARDY et al., 2017). No entanto, uma ativação excessiva de células T observada durante doenças virais graves, como infecção por DENV grave ou Ebola (EBOV), pode ser prejudicial ao hospedeiro, aumentando a inflamação e promovendo uma anergia de células T protetoras (AGRATI et al., 2016; FALASCA et al., 2015; MATHEW; ROTHMAN, 2008; MCELROY et al., 2015). Pardy e colaboradores demonstraram que a infecção por ZIKV induz uma ativação significativa de células LT-CD8<sup>+</sup> e LT-CD4<sup>+</sup>. A frequência de células LT-CD8<sup>+</sup> co-expressando CD38 e moléculas HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II) do complexo de histocompatibilidade maior (MHC-II) foi semelhante em pacientes com ZIKV e DENV, porém menor que durante a infecção por EBOV, sugerindo que uma ativação moderada pode estar associada a atividade protetora e um perfil leve da doença (AGRATI et al., 2016; MATHEW; ROTHMAN, 2008; MCELROY et al., 2015). Em infecções agudas, como as causadas pelos DENV ou EBOV, a ativação de células T está associada a uma expressão aumentada de marcadores apoptóticos, porém o papel da apoptose durante a infecção por ZIKV ainda não foi esclarecido (TORRENTES-CARVALHO et al., 2014; PARDY et al, 2017).

A capacidade dos linfócitos T de se diferenciarem em células efetoras também é uma característica chave de uma resposta protetora. Durante a infecção pelo ZIKV, foi descrita uma diferenciação das células LT-CD4<sup>+</sup> em células de memória e efetoras, sugerindo a aquisição de perfis de citotoxicidade e de produção de citocinas (PARDY et al., 2017). O mesmo fenótipo efetor de células T foi também descrito em um modelo de infecção por ZIKV em camundongos. No entanto, observou-se uma redução significativa de células LT-CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  em relação aos pacientes com DENV, sendo possível especular que as células LT-CD4<sup>+</sup> foram polarizadas durante a infecção pelo ZIKV para produzir citocinas e quimiocinas diferentes do IFN- $\gamma$ . A capacidade do ZIKV de inibir a produção e a resposta do IFN-I foi relatada, mas a redução da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T representa uma nova descoberta, cujo papel no contexto de proteção/patogênese necessita de mais investigações (BOWEN et al., 2017; GRANT et al., 2016).

Além disso, Cimini e colaboradores demonstraram uma expansão substancial de células T $\gamma\delta$ 2 de fenótipo efetor, expressando granzima B, durante a infecção pelo ZIKV, que foi mais pronunciada durante os primeiros dias do início dos sintomas (CIMINI et al., 2017). A importância do papel das células T $\gamma\delta$ 2 em uma resposta imune bem orquestrada contra à infecção viral está bem documentada (POCCIA et al., 2005). De fato, as células T $\gamma\delta$  humanas podem afetar a progressão e o resultado de doenças infecciosas (POCCIA et al., 2006; TU et al., 2011). Células T $\gamma\delta$ 2 ativadas são capazes de exercer atividades antivirais diretas e realizar várias atividades estimulatórias em ambas as células imunes, inatas e adaptativas (AGRATI et al., 2009; POCCIA et al., 2005; VANTOUROUT; HAYDAY, 2013). Vários estudos sugerem um papel protetor durante infecções virais agudas, como em resposta à infecção pelo WNV, as células T $\gamma\delta$  expandem-se rapidamente e produzem uma quantidade significativa de IFN- $\gamma$ , limitando a carga viral e protegendo o hospedeiro da encefalite letal (WANG, 2011; WANG et al., 2006). Além disso, o perfil Th1 das células T $\gamma\delta$ 2 pode contribuir para a lesão da placenta e/ou inflamação que é correlacionada com a lesão cerebral fetal durante a infecção pelo ZIKV (MOR, 2016). Finalmente, as células T $\gamma\delta$  também podem desempenhar um papel durante as doenças autoimunes e, em particular, durante a síndrome de Guillain Barré, contribuindo para os danos autoimunes (PAUL; SHILPI; LAL, 2014; VAN RHIJN et al., 2003; WINER et al., 2002).

### 1.1.6 Mecanismos de Evasão Viral

Em defesa a respostas antivirais do hospedeiro, os vírus reagem por diversos mecanismos. A evasão imunitária é mediada pelas proteínas não estruturais, especialmente NS1 e NS5, que atuam coletivamente para limitar e escapar das respostas imunes através da interferência com vias de sinalização. Foi mostrado que as proteínas virais NS1, NS4B e NS2B3 inibem a indução de ISGs a jusante de IFN através de várias vias, incluindo a inibição da sinalização de IFN- $\beta$  e JAK STAT (WU et al., 2017). Além disso, o ZIKV inibe a sinalização da via de IFN tipo I e RIG I em CDs, antagonizando a fosforilação de STAT1 e STAT2, além de bloquear as respostas mediadas por células NK, sistema complemento, linfócitos B e T (ASIF et al., 2017; BOWEN et al., 2017; JOST; ALTFELD, 2013; YE et al., 2013). Um estudo mostrou que a proteína NS5 de um isolado brasileiro recente do ZIKV bloqueou a indução do IFN tipo I a jusante dos RLRs e também inibiu a sinalização do IFNAR (HERTZOG et al., 2018). Mecanicamente, a NS5 mediou a degradação proteossômica de STAT2 humana, mas não de camundongo, e bloqueou a fosforilação de STAT1, dois fatores de transcrição ativados por IFN tipo I (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Outra pesquisa mostrou que a proteína NS5 da estirpe ZIKV<sub>MR766</sub> antagonizou a produção de IFN através da inibição da ativação da quinase ligadora de TANK 1 (TBK1), que fosforila o IRF3. A proteína NS5 interagiu com o domínio semelhante à ubiquitina de TBK1, o que resulta em menos complexo de TBK1 e TRAF6, levando à ativação atenuada de TBK1 e fosforilação de IRF3 (LIN et al., 2019).

Glasner e colaboradores observaram que a infecção pelo ZIKV é detectada por RIGI e IRF3, o que leva à secreção do IFN tipo I, resultando em um aumento da expressão do MHC-I. Já havia sido demonstrado que flavivírus são capazes de regular as moléculas do MHC-I durante a infecção, em parte induzindo a expressão de IFN- $\beta$  em camundongos e humanos, e foi demonstrado que este processo é dirigido pela via do NF $\kappa$ B (KESSON; KING, 2002; KING; KESSON, 1988; SHEN et al., 1997). A elevação da expressão de MHC classe I resulta em um aumento da lise de células T e inibição da morte de células NK (LIU et al., 1989). Propõe-se que o ZIKV não inibe completamente a resposta de IFN, mas sim a explora, com objetivo de regular positivamente as proteínas do MHC classe I e, assim, inibir a atividade das células NK. Esta hipótese é apoiada pela observação do aumento da secreção de IFN- $\gamma$  pelas células NK após a sua interação com células infectadas, o que provavelmente contribui com a capacidade das células alvo de regular as moléculas de MHC classe I e escapar da morte direta pelas células NK. O fato de MHC classe I estar significativamente

superexpresso indica que os mecanismos de escape do vírus são direcionados principalmente contra as células NK. Especula-se que a ausência de mecanismos virais para inibir a atividade das células T seja devida à sua rápida cinética de replicação (GLASNER et al., 2017).

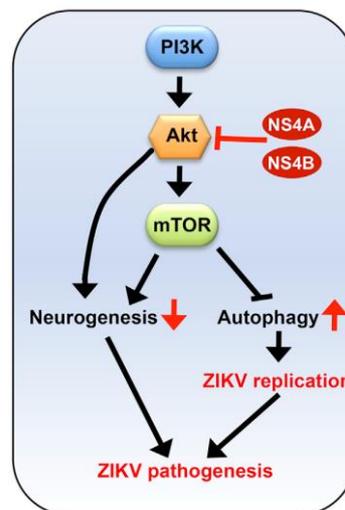
### **1.1.7 Patogênese do Zika**

O processo inflamatório que ocorre após a disseminação do vírus para os tecidos causa o recrutamento de monócitos inflamatórios e células NK, em associação com o desenvolvimento de vários sintomas clínicos, incluindo dores de cabeça, nas costas e musculares, náuseas e vômito, erupção cutânea, artralgia e mialgia (PETITDEMANGE et al., 2014; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015; PINGEN et al., 2017; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). No entanto, apesar de certas semelhanças clínicas nas infecções por flavivírus, também existem diferenças nas manifestações mais graves das doenças, como a proeminente e prolongada artralgia causada pelo CHIKV, a febre hemorrágica pelo DENV e a microcefalia e outras manifestações neurológicas pelo ZIKV (GOULD; SOLOMON, 2008; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015; WIKAN; SMITH, 2016).

O ZIKV apresenta extenso tropismo celular e tecidual, sendo encontrado em vários fluidos corporais, como sangue, lágrimas, saliva, sêmen, secreções vaginais, urina, líquido cefalorraquidiano e líquido amniótico (MINER; DIAMOND, 2017; NGONO; SHRESTA, 2018). A presença do ZIKV afeta a função de muitos órgãos do hospedeiro mamífero, especialmente os órgãos e tecidos privilegiados, como cérebro, olhos, testículos e placenta. Estes órgãos suportam a infecção, amplificação do vírus e podem servir como reservatórios virais (KALKERI; MURTHY, 2017). Além disso, o ZIKV é capaz de atravessar a placenta e infectar o líquido amniótico e os tecidos cerebrais fetais, causando um impacto significativo no desenvolvimento cerebral (MAGNANI et al., 2018). Estudos recentes mostraram que a patogênese das infecções por ZIKV depende dos estágios do desenvolvimento cerebral. A infecção no início do período gestacional causa a morte fetal, enquanto a infecção no final do período gestacional está associada à redução significativa das NPCs, já que o ZIKV induz uma lesão substancial no cerebral fetal, ao inibir a proliferação de células-tronco neuronais e induzir a sua diferenciação prematura especialmente no córtex temporal, no giro dentado e no hipocampo (ADAMS WALDORF et al., 2018; COFFEY et al., 2018; LI et al., 2016a). Já a infecção pós-natal causa alterações

estruturais e funcionais persistentes do sistema nervoso central, incluindo mudanças maturacionais em regiões específicas do cérebro (MAVIGNER et al., 2018).

Além disso, a infecção interrompe a homeostase metabólica celular, o que favorece a replicação viral nas células infectadas (ALLONSO et al., 2015; FONTAINE et al., 2015; TIWARI et al., 2017). O perfil global de expressão gênica de diferentes linhagens celulares infectadas, incluindo a micróglia, revelou diferenças significativas nos processos metabólicos do hospedeiro (TIWARI et al., 2017). Foi demonstrado que a infecção pelo ZIKV induz a reprogramação do metabolismo da glicólise, a fim de apoiar a síntese de proteína e RNA virais (FRUMENCE et al., 2016). Na infecção de células da glia, foi observado um aumento da expressão de superóxido dismutase 2 (SOD2) mitocondrial, um gene antioxidante, em resposta ao estresse oxidativo elevado, além de modular o metabolismo celular nas células neuronais com base nos estágios de diferenciação. Por outro lado, a ativação do p53 e a inibição da via da rapamicina em mamíferos (mTOR) pelas NS4A e NS4B do ZIKV em células-tronco neuronais induzem diferenciação prematura, apoptose e exaustão de células-tronco, colaborando com a inibição da neurogênese, com o aumento da replicação viral e com a patogênese neurológica associada (Figura 9) (ROTHAN et al., 2019; TRICARICO et al., 2017).



**Figura 9. Duas proteínas do ZIKV, NS4A e NS4B, inibem a sinalização de Akt-mTOR, bloqueiam a neurogênese e promovem a autofagia. A sinalização de Akt-mTOR é uma das vias essenciais para o desenvolvimento do cérebro e para a regulação da autofagia, a qual também é um mecanismo ativo de proteção celular contra a infecção viral. A ativação de mTOR pela sinalização de Akt e MAPK suprime a autofagia, e a inativação de mTOR pela AMPK e sinalização de p53 promovem autofagia. Os vírus tentam, assim, modular a autofagia para beneficiar seus ciclos de vida e estabelecer infecção persistente. A infecção do ZIKV em células-tronco neurais fetais humanas causa inibição da via Akt-mTOR, levando à neurogênese defeituosa e à ativação aberrante da autofagia. Adaptado de Liang et al., 2016.**

### 1.1.8 Vírus Zika e o Sistema Nervoso Central

O ZIKV foi detectado nos cérebros *post-mortem* de fetos microcefálicos ou natimortos e no CSF de adultos encefalíticos, indicando que o vírus invade de alguma forma o SNC (CARTEAUX et al., 2016; MLAKAR et al., 2016). De fato, numerosos estudos indicaram que o ZIKV é neurotrópico. RNA viral foi detectado no cérebro de camundongos inoculados por diferentes vias, também em organóides cerebrais infectados *in vitro*, e no CSF de macacos rhesus infectados (ALIOTA et al., 2016; CUGOLA et al., 2016; GARCEZ et al., 2016). ZIKV da linhagem brasileira pode infectar o feto, causando restrição no crescimento intrauterino, incluindo sinais de microcefalia em camundongos. Por outro lado, achados clínicos e epidemiológicos apontaram uma correlação entre a infecção pelo ZIKV e o aumento de casos de manifestações neurológicas semelhantes à GBS (CAO-LORMEAU, 2014; VAN DEN BERG et al., 2014). Vírus da cepa africana (ZIKV<sub>MR766</sub>) também foi capaz de infectar *in vitro* células-tronco humanas pluripotentes derivadas de NPCs, induzindo morte celular por apoptose (TANG et al., 2016).

A infecção pelo ZIKV foi associada à anormalidades cerebrais graves, como a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ), em recém-nascidos (CHIMELLI et al., 2017; DEL CAMPO et al., 2017; SCHULER-FACCINI et al., 2016). A SCZ se caracteriza por microcefalia e outras anormalidades, como defeitos visuais, deficiência auditiva, deformidades esqueléticas e epilepsia, e ocorre em 6% a 12% dos casos de gestantes infectadas pelo ZIKV (FRANÇA et al., 2016). Estas observações sugerem que a infecção pelo ZIKV durante a gravidez não é completamente responsável pelo fenótipo da SCZ e outros fatores de suscetibilidade podem estar envolvidos. Estudos realizados por Mc Grath e colaboradores demonstraram que NPCs de diferentes indivíduos poderiam responder diferentemente à infecção pelo ZIKV. Isto foi observado pela modulação diferencial das vias de sinalização intracelular, especialmente as relacionadas à imunidade inata, ciclo celular e sinalização pela via mTOR (MCGRATH et al., 2017). Gêmeos discordantes representam um bom caso-controle para testar a contribuição genética que determina o resultado dos fetos da infecção gestacional. Um estudo realizado por Caires-Júnior e colaboradores mostrou que NPCs derivadas de gêmeos dizigóticos discordantes para a SCZ apresentaram significativas diferenças na expressão de genes relacionados a reguladores das principais vias do desenvolvimento neural (mTOR e Wnt), o que poderia explicar as diferentes suscetibilidades à infecção pelas cepas de ZIKV. Entretanto, não foi possível identificar um *locus* principal associado à síndrome, sugerindo que a SCZ poderia ser um distúrbio multifatorial, em que

determinados genótipos localizados em regiões reguladoras poderiam ser responsáveis por diferentes respostas epigenéticas, tornando estas preditoras da SCZ (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018).

Os vírus podem atingir o cérebro através de diferentes mecanismos, incluindo o sistema nervoso periférico e transporte axonal, além da via hematogênica. Dada a natureza sistêmica da infecção por flavivírus, e o fato de que a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) é frequentemente observada em modelos experimentais de infecção, acredita-se que o cruzamento dessa estrutura seja um mecanismo importante para a neuroinvasão dos flavivírus (JURADO et al., 2018; VERMA et al., 2010; WANG et al., 2018). A BHE é uma estrutura complexa, composta por células endoteliais da microvasculatura cerebral (BMECs), que estão associadas a pericitos, astrócitos e microglia (DA CONCEIÇÃO et al., 2013; MINKIEWICZ; DE RIVERO VACCARI; KEANE, 2013; SOFRONIEW, 2015).

Jurado e colaboradores investigaram o papel da deficiência de IFNAR em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas em um modelo de infecção por ZIKV em camundongo. Foi demonstrado que a resposta do IFN em células não hematopoiéticas era essencial para proteção contra disseminação viral no cérebro, a ruptura da BHE e a neuropatologia induzida pelo ZIKV. Já a paralisia induzida pelo vírus foi dependente da infiltração de células LT CD8<sup>+</sup> no cérebro, indicando que a infiltração de leucócitos devido à ruptura da BHE pode ser um fator relevante na neuropatogênese. A inoculação de ZIKV em camundongos C57BL/6J ou 129S1/SvImJ, no 14º dia do período embrionário, afetou o desenvolvimento neurovascular, resultando em microcefalia pós-natal e dano cerebral. A análise dos cérebros no período pós-natal indicou um aumento significativo na densidade e diâmetro dos vasos no córtex cerebral, com evidências de permeabilidade da BHE. Além disso, os cérebros exibiram extensa ativação microglial, astrogliose e altos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sugerindo que uma resposta imune excessiva também pode prejudicar o desenvolvimento neurovascular, levando ao aumento da permeabilidade da BHE e danos cerebrais (SHAO et al., 2016).

A infecção de BMECs por vírus pode resultar em morte celular ou diminuição da expressão e organização de proteínas de junção celular (TJ), impactando diretamente na integridade da monocamada endotelial. (DA CONCEIÇÃO et al., 2013; PAPA et al., 2017a; ROCHFORD et al., 2014; SCHREIBELT et al., 2007). As células endoteliais da BHE são circundadas pela membrana basal, cuja estrutura e função são sustentadas e reguladas por

pericitos adjacentes, astrócitos e microglia (CHOW; GU, 2015). Os mediadores produzidos após a ativação da BMEC ou após o dano no SNC afetam a função dos astrócitos. Além disso, essas células podem ser diretamente infectadas e ativadas por vírus (CHANG et al., 2015; HUSSMANN et al., 2012). Todos esses estímulos citados promovem uma resposta denominada astrogliose, no qual há produção citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (NO). Esses mediadores modulam a angiogênese, afetam a expressão e organização das proteínas TJ, restringem ou estimulam a infiltração de leucócitos e causam impacto na função neuronal (ARGAW et al., 2012; SOFRONIEW, 2015; ZAMANIAN et al., 2012). Assim, insultos como infecção viral e inflamação podem estimular as BMECs, astrócitos, microglias e outras células a secretarem mediadores que afetam a integridade da BHE e a função do SNC (ALVAREZ; KATAYAMA; PRAT, 2013; ARGAW et al., 2012; FABRY et al., 1995; HEINEMANN; KAUFER; FRIEDMAN, 2012).

Dada a natureza sistêmica da infecção por flavivírus e a função fisiológica da BHE, acredita-se que a ruptura da barreira seja um evento determinante que precede a invasão viral. Um ponto importante que sustenta essa concepção é que as BMECs, que são os principais tipos celulares na BHE, são suscetíveis a todos os flavivírus neurotrópicos (JEV, WNV, ZIKV e vírus da encefalite transmitida por carrapatos, TBEV) e a infecção induz a apoptose (DA CONCEIÇÃO et al., 2013; LAZEAR et al., 2015; PAPA et al., 2017a; VERMA et al., 2009; WANG et al., 2008a, 2008b). Porém, evidências crescentes sugerem que os flavivírus também podem alcançar o SNC cruzando a BHE sem rompê-la. A liberação basolateral de partículas infecciosas após a replicação do vírus em BMECs foi descrita em diferentes modelos experimentais, nos quais nenhum efeito citopático significativo foi detectado (PAPA et al., 2017a; VERMA et al., 2009). O ZIKV pode atravessar a barreira endotelial como vírus livre de células ou também pode atingir o SNC como partícula associada a células, através de um mecanismo chamado “cavalo de Tróia”. Neste contexto, os leucócitos periféricos infectados transmigram através da camada de células endoteliais e liberam vírus dentro do SNC. Após a entrada no cérebro por qualquer uma das vias descritas, os flavivírus podem infectar os astrócitos, microglias, pericitos e neurônio. A infecção dessas células, especialmente astrócitos e microglias, induz a liberação de mediadores inflamatórios e metaloproteinases que medeiam a regulação negativa de proteínas da TJ, resultando em aumento da permeabilidade (MUSTAFÁ et al., 2019). A invasão viral no SNC por todos esses mecanismos é frequentemente seguida por infiltração de leucócitos. Tanto a replicação viral em neurônios quanto a resposta inflamatória local desencadeada posteriormente foram

relatadas como sendo relevantes na neuropatogênese da infecção por flavivírus. A inflamação subsequente induzida após a invasão do SNC pelo vírus também pode contribuir para a degradação da BHE e amplificar todo o processo (DOUAM et al., 2017; LI et al., 2015; LUCAS et al., 2018; ROE et al., 2012; VELANDIA-ROMERO; ACOSTA-LOSADA; CASTELLANOS, 2012; WANG et al., 2018).

A infecção pelo ZIKV induz neuroinflamação na microglia, culminando na produção de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFNs, óxido nítrico sintase (iNOS) e NO. A expressão dessas citocinas foi detectada no tecido cerebral fetal primário de pacientes infectados pelo ZIKV (LUM et al., 2017). Por outro lado, confirmam e ampliam a observação de que a infecção por flavivírus induz a produção de uma ampla gama de mediadores pró-inflamatórios pelas células microgliais, como mostrado anteriormente em um modelo animal experimental de JEV (GHOSHAL et al., 2007). Já foi mostrado que a infecção pelo ZIKV é capaz de desregular a progressão do ciclo celular e induzir apoptose, além de causar morte neuronal através da produção de altos níveis de NO, o que pode contribuir com os distúrbios neurológicos causados pelo ZIKV (BROWN; VILALTA, 2015; GARCEZ et al., 2016; LI et al., 2016a; TANG et al., 2016). O acúmulo de citocinas e quimiocinas consistente com a forte resposta inflamatória, contribui para o dano tecidual, e tem sido hipotetizado como causador das doenças autoimunes decorrentes da infecção pelo ZIKV, como a GBS (CAO-LORMEAU et al., 2016).

Além disso, o ZIKV é capaz de regular a lisofosfatidilcolina (LPC) na micróglia. Essa cadeia de ácidos graxos está envolvida na alteração das estruturas de membrana e podem mediar a inflamação aguda em toda a vasculatura e tecidos locais (DIOP et al., 2018). Foi demonstrado que a exposição *in vitro* e *in vivo* de células microgliais à LPC induz a transformação da morfologia, de ramificada para ameboide, o que sugere a ativação dessas células (STREIT; WALTER; PENNELL, 1999). De fato, foi demonstrado que a LPC estimula o processamento e a liberação de IL-1 $\beta$  pela micróglia (STOCK et al., 2014). Este lisofosfolípídeo também está envolvido na neuroinflamação pela ativação da via do inflamassoma na micróglia, induzindo o aumento da produção de IL-1 $\beta$  e assim, a neuroinflamação (HISHIKAWA et al., 2008). Além da LPC, a expressão de fosfatidilcolina (PC) também foi induzida em células gliais infectadas pelo ZIKV. A PC foi previamente associada à ativação celular durante a infecção com vírus de RNA de fita positiva, resultando em um aumento ou acúmulo dessa classe de lipídios. É importante destacar que a PC é

utilizada na formação de partículas virais, e é sintetizada no local dos complexos de replicação viral (ZHANG et al., 2016).

Os esfingolípídios C14 esfingomiéline e ceramida determinam as propriedades biofísicas das membranas celulares, desempenhando um importante papel em diferentes processos, como a diferenciação celular e a regulação da apoptose (BOLLINGER; TEICHGRÄBER; GULBINS, 2005). Ambos os metabólitos foram detectados durante a infecção pelo ZIKV, e a sua presença pode ser devida à biossíntese ativa dos esfingolípídios, que é necessária para a infecção das células pelos flavivírus (MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ, 2016). Tem sido demonstrado que as ceramidas medeiam a produção de citocinas inflamatórias através da fosforilação da Quinase c-Jun N-terminal (JNK), enquanto a ceramida ativa o receptor TLR 4 e o inflamassoma, o que resulta na produção de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Portanto, a indução de tais citocinas pró-inflamatórias em células microgliais infectadas pelo ZIKV é provavelmente mediada também por esfingolípídios (NISHIYAMA et al., 2018). Por fim, pode-se destacar o importante papel da microglia na neuroinflamação e no metabolismo lipídico durante a infecção pelo ZIKV. A síntese de metabólitos lipídicos por essas células pode contribuir para a produção de citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel crucial na neuroinflamação induzida pelo ZIKV (DIOP et al., 2018).

#### **1.1.8.1 SNC e Micróglia**

As micróglia distribuem-se no encéfalo e na medula espinhal, representando cerca de 5 a 20% de todas as células da glia. Em contraste com as outras células da glia, a micróglia tem origem mesodérmica, derivando da linha hematopoiética (GRAEBER; STREIT, 2010; HUBER et al., 2013; SAIJO; GLASS, 2011). Sua morfologia é distinta quando comparada com os macrófagos presentes em outros tecidos, apresentando muitos prolongamentos finos e curtos, o que permite uma elevada área de contato com o meio circundante. Esta morfologia é designada de “ramificada” e reflete o estado residente da micróglia. Por outro lado, em condições de fagocitose, frente a uma lesão do SNC, adquirem uma morfologia semelhante à dos macrófagos, esférica e sem prolongamentos, contendo numerosos vacúolos fagocitários, sendo designada “micróglia ativada” ou “micróglia amebóide” (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013).

Durante o desenvolvimento encefálico, a micróglia dá suporte à sinaptogênese através da síntese de fatores neurotróficos, da regulação e remodelamento da transmissão

sináptica (POLLARD, 2004). Além disto, auxilia na sobrevivência dos neurônios através da liberação de diversos fatores, como o Fator de Crescimento do Nervo (NGF), o Fator de Crescimento Transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), entre outros (SAIJO; GLASS, 2011). Por fim, a micróglia também auxilia a remielinização, a oligodendrogênese e a angiogênese, além de controlar diretamente a morte neuronal (OUSMAN; KUBES, 2012). Por outro lado, sabe-se que a atividade neuronal e o seu microambiente controlam o estado quiescente da micróglia, e a sua própria atividade é alvo da supervisão neuronal. Os neurônios suprimem a ativação da micróglia por intermédio do contato célula-a-célula, através da liberação de moléculas como, por exemplo, o ligante da quimiocina CX3C (CX3CL1) e, ainda, por proteínas regulatórias expressas na sua superfície, como CD47, CD200, CD22 (SAIJO; GLASS, 2011). Além disso, as micróglia são as principais células imunes no SNC, sendo consideradas os macrófagos do SNC, pois podem ser ativadas por uma ampla variedade de estímulos patológicos, incluindo trauma, inflamação, degeneração e isquemia, além de fatores físicos, como radiação eletromagnética, radiação ionizante e infrassom (GIULIAN et al., 1989; GONZÁLEZ-SCARANO; BALTUCH, 2002; ITO et al., 1998; MCGEER; MCGEER, 1995; MOORE; THANOS, 1996).

O efeito que essas células exercem no SNC é dúbio, podendo contribuir para a eliminação de microrganismos e debris deletérios, além de estar envolvida na neuroproteção através da produção de fatores neurotróficos (MOORE; THANOS, 1996; STREIT; GRAEBER; KREUTZBERG, 1988). Por outro lado, a micróglia também pode exercer uma função citotóxica, através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), NO e citocinas inflamatórias, que podem promover a neuroinflamação e o dano tecidual no SNC (COLTON; GILBERT, 1987; SMITH; VAN DER MAESEN; SOMERA, 1998). O lipopolissacarídeo (LPS) é um forte indutor de ativação microglial, modulando fatores de transcrição como o NF $\kappa$ B, além de produzir iNOS, NO, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (HORVATH et al., 2008; GENC; TUFEKCI; GENC, 2011). Estudos realizados em macrófagos periféricos *in vitro* e na microglia de animais, resultaram na definição de dois estados de ativação específicos: M1 (ativação clássica - pró inflamatória) e M2 (ativação alternativa - anti-inflamatória). Alguns autores sugeriram que estes estados de ativação podem ser de funções sobrepostas contínuas, ao invés de categorias. Porém, embora a ativação microglial possa ser acompanhada por alterações morfológicas, não pode-se prever com precisão a função que está sendo realizada por uma

célula microglial somente por este fator (GORDON; MARTINEZ, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008; SCHWARTZ et al., 2006).

Os marcadores mais usados na identificação da micróglia são o cluster de diferenciação 45 (CD45), CD11b, CD68 (também denominado macrossialina), MHC-II e a Molécula Adaptadora de Ligação ao Cálcio Ionizado 1 (Iba-1) (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013). CD68 é uma glicoproteína transmembranar lisossomal/endossomal de 110 kDa expressa nas células da linhagem hematopoiética mielóide, incluindo a micróglia, sendo regulada pela via mTOR (HOLNESS; SIMMONS, 1993; MATSUMOTO et al., 2007; SHEN; SIDIK; TALBOT, 2016). A micróglia quiescente expressa níveis baixos de CD68, porém sua expressão sofre acentuada elevação na micróglia ativada em todo o cérebro, sendo frequentemente usado como um marcador de ativação microglial (TANAKA et al., 2013; VAN VLIET et al., 2012). Porém, Zhao e colaboradores observaram um aumento de CD68 desacompanhado do aumento da expressão de citocinas inflamatórias, o que indica que a micróglia ativada não necessariamente apresenta perfil inflamatório (ZHAO et al., 2018). Assim como o CD68, o MHC-II, expresso por todas as células apresentadoras de antígeno, também tem baixa expressão na micróglia quiescente, elevando na micróglia ativada (GRAEBER; SCHEITHAUER; KREUTZBERG, 2002; OUSMAN; KUBES, 2012). Já Iba1 é uma proteína de 17 kDa de expressão constitutiva específica da micróglia, também regulada positivamente durante as respostas reativas, possui um papel importante na mobilidade celular e fagocitose (IMAI et al., 1996; ITO et al., 2011; OHSAWA et al., 2000).

## **1.2 MicroRNAs e Infecções Virais**

A resposta do hospedeiro à infecção microbiana é um processo amplamente estudado e caracteriza-se por mudanças na expressão gênica, tanto do hospedeiro como do patógeno (LEE et al., 2014). Os microRNAs (miRNAs, miRs) são uma classe importante de pequenos RNAs (20-25 nt) de fita simples, não-codificantes, que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento, proliferação, diferenciação, apoptose e defesa do hospedeiro (BARTEL, 2009).

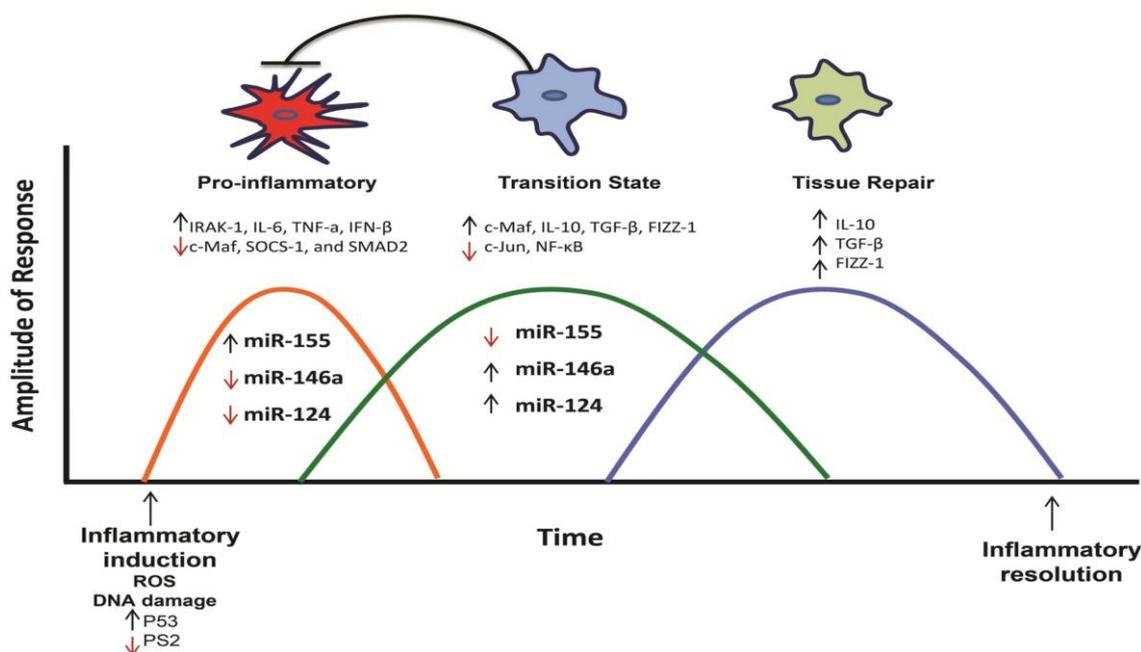
Os miRNAs regulam a expressão gênica pós-transcricional por ligação a sequências parcialmente complementares, normalmente na região 3' UTR do mRNA alvo (GRIMSON

et al., 2007). Dependendo do grau de complementaridade, a ligação pode resultar em repressão traducional, degradação ou regulação positiva do mRNA alvo (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). Os possíveis mecanismos de repressão gênica mediada por miRNAs em células animais são: indução a deadenilação e a degradação de mRNAs alvo (WU; FAN; BELASCO, 2006); repressão do início da tradução tanto no estágio de reconhecimento do *cap* (MATHONNET et al., 2007), quanto no estágio de união com a subunidade 60S (CHENDRIMADA et al., 2007); repressão pós-iniciação da tradução devido ao alongamento retardado ou ao "*drop-off*" do ribossomo (PETERSEN et al., 2006); e clivagem proteolítica de polipeptídeos nascentes, também foi proposto como um mecanismo de repressão da produção de proteínas induzida por miRNAs (NOTTROTT; SIMARD; RICHTER, 2006). Além dos miRNAs celulares, muitos miRNAs codificados por vírus têm sido descritos desde a primeira descoberta dos miRNAs codificados pelo vírus Epstein-Barr (PFEFFER et al., 2004).

Estudos demonstraram que os miRNAs estão intimamente relacionados com a ocorrência e desenvolvimento de doenças, regulando tanto as respostas imunes inatas, quanto as adaptativas na neuroinflamação (ALVAREZ-GARCIA, 2005; CROCE; CALIN, 2005; MENDELL, 2005). Já foi demonstrado que mecanismos epigenéticos, como miRNAs e metilação do DNA, participam da neuroinflamação em condições neuropatológicas (CHERAY; JOSEPH, 2018; SAIKA et al., 2017). Além disso, numerosos miRNAs têm sido associados à doenças infecciosas, desempenhando um papel importante no retardo da progressão da doença, ou ajudando o vírus a escapar da resposta imune do hospedeiro (CHEN et al., 2012; SONG et al., 2010; ZHU et al., 2014).

Os miR-155, 146a e 124 desempenham papéis significativos tanto na ativação, como na resolução da resposta inflamatória das micróglia, podendo ser classificados como de expressão inicial e tardia (Figura 10) (SU; ALOI; GARDEN, 2016). Evidências consistentes indicaram que o aumento do miR-155 em condições neurológicas está associado com o aumento da inflamação no SNC e alterações patológicas (THOME et al., 2016). Além disso, o miR-155 foi o primeiro miRNA relatado a estar diretamente ligado à ativação microglial. Evidências indiretas têm mostrado que a inibição do miR-155 melhora a patogênese do AVC isquêmico em camundongos, diminuindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, e este processo provou ser mediado pela via de sinalização do NFκB em macrófagos (CABALLERO-GARRIDO et al., 2015; WU et al., 2014). Outros estudos indicaram que o miR-155 exerce efeitos pró-inflamatórios ao visar diferentes mediadores da sinalização

inflamatória, incluindo SOCS-1 e SHIP1 (CARDOSO et al., 2012; CEPPI et al., 2009; ELTON et al., 2013). SHIP1 inibe as interações TLR-MyD88 dependentes de PI3-quinase e a ativação de NF- $\kappa$ B, regulando negativamente a sinalização de TLR (MANN, 2011). Há evidências crescentes de que o miR-155 regula negativamente as vias de sinalização de TLR inibindo proteínas chaves da sinalização. Assim, a proteína de ligação 2 da quinase 1 ativada por TGF- $\beta$  (TAB2), uma molécula a jusante de TRAF6 que ativa proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), foi confirmada como um alvo direto de miR-155 (CEPPI et al., 2009).



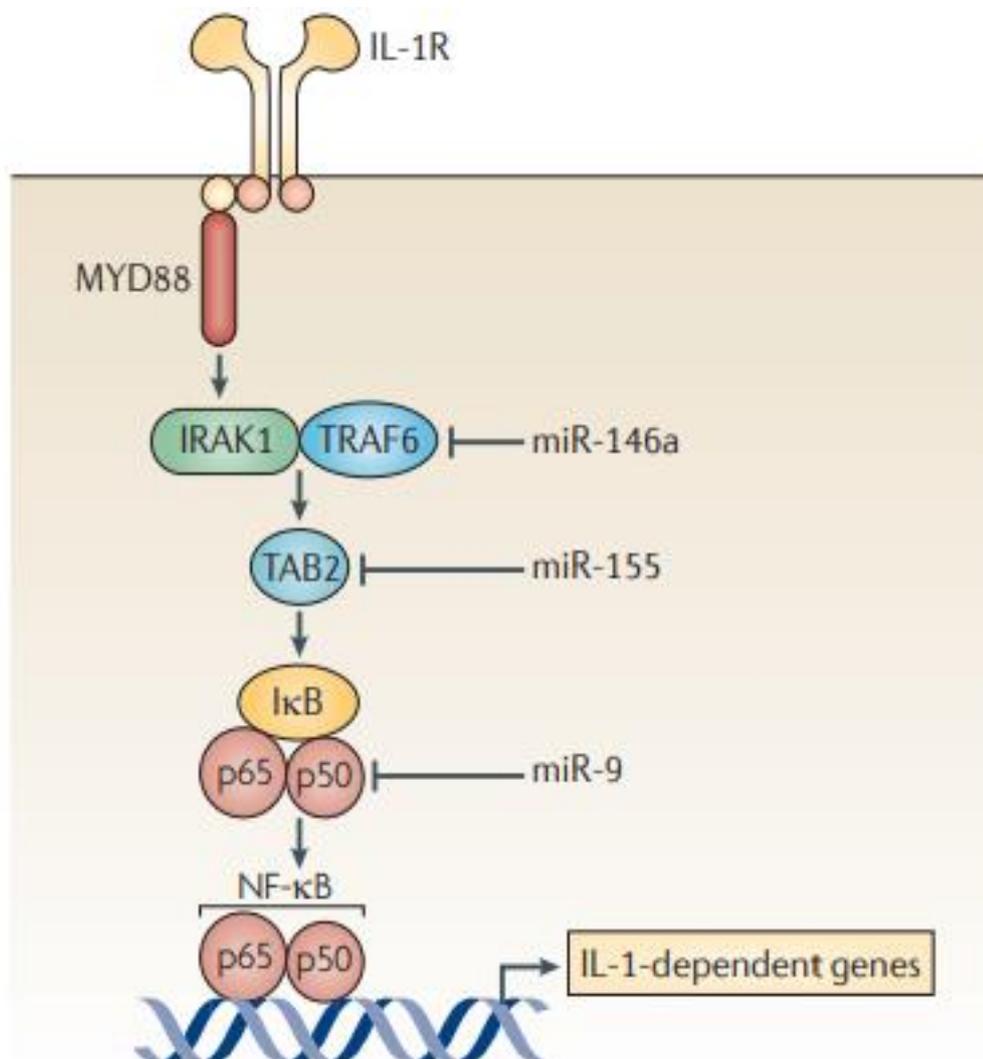
**Figura 10. MicroRNAs envolvidos nas respostas inflamatórias da microglia.** Quando um estresse (patógenos ou dano ao DNA) é detectado, a microglia inicialmente transforma sua morfologia e assinatura molecular, levando ao início da resposta pró-inflamatória. A microglia pró-inflamatória demonstra aumento de miR-155 e diminuição dos miR-124 e miR-146a. Essas alterações nos miRNAs promovem a atividade transcricional do NF- $\kappa$ B e a expressão de moléculas pró-inflamatórias (IRAK-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\beta$ ). Após a indução de mediadores pró-inflamatórios, a expressão dos miRNAs muda para regulação negativa de miR-155 e regulação positiva dos miR-146a e miR-124. Isto promove um estado inflamatório transitório em que a expressão de moléculas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ) ocorre. A regulação positiva de mediadores anti-inflamatórios promove as funções de reparação tecidual da microglia e a redução mediada por miRNAs de reguladores transcricionais pró-inflamatórios e a regulação positiva de moléculas envolvidas na reparação tecidual. **Adaptado de Su; Aloji; Garden, 2016.**

Após a exposição a um sinal pró-inflamatório, como por exemplo LPS, a microglia passa a expressar o miR-155, mas tem a expressão reduzida de miR-146a e miR-124. Após a indução de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF $\alpha$ ), a expressão dos miRNAs muda para regulação negativa do miR-155 e positiva do miR-146a e miR-124, promovendo a

expressão de moléculas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ , c-Maf) (SU; ALOI; GARDEN, 2016). O miR-155 aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias, por mecanismos envolvendo a inibição do mRNA da proteína SOCS1 e participando da rede pró-inflamatória mediada por p53 na micróglia (JAYADEV et al., 2011; SU et al., 2014). SOCS1 regula negativamente a via de sinalização JAK/STAT que culmina na produção de IFN, além de se associar a IRAK1-TRAF6 e bloquear a sinalização de TLR (BAETZ et al., 2004; MANN, 2011). Já o miR-146a tem como alvos moleculares validados a IRAK1, IRAK2 e o TRAF6 (TAGANOV et al., 2006), componentes da via de MyD88. Pelo que foi postulado, o miR-146a pode regular negativamente a via de sinalização MyD88-NF $\kappa$ B ativada pelos TLRs 2, 4 e 5 (HOU et al., 2009). A sinalização pró-inflamatória através da via de transcrição NF $\kappa$ B leva ao aumento da expressão de miR-146a, o qual subsequentemente suprime a atividade transcricional de NF $\kappa$ B (LI et al., 2011), servindo como um mediador de *feedback* negativo de respostas pró-inflamatórias. Já o miR-124 promove a quiescência da micróglia (CALDEIRA et al., 2014; PONOMAREV et al., 2011), levando a uma regulação negativa de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como aumento da expressão de várias proteínas associadas à resolução da inflamação e/ou reparo tecidual (PONOMAREV et al., 2011). Dessa forma, tanto o miR-155 como o miR-146a, parecem desempenhar um papel fundamental no perfil inflamatório da micróglia. Enquanto o miR-146a atua como um regulador negativo da inflamação pela supressão da atividade transcricional do NF $\kappa$ B, o miR-155 geralmente atua como um potencializador das respostas pró-inflamatórias mediadas pela micróglia (SU; ALOI; GARDEN, 2016).

Muitos estudos têm mostrado que as principais funções dos miRNAs estão relacionadas com a indução de um *feedback* negativo mediante a inibição de fatores de transcrição necessários para sua própria indução (MARTINEZ; WALHOUT, 2009). Alguns exemplos são o miR-155/FOXP3/NF- $\kappa$ B (GOTTWEIN et al., 2007; KOHLHAAS et al., 2009), o miRNA-27b/PPAR $\gamma$  (JENNEWEIN et al., 2010) e o miRNA-132/CREB (LAGOS et al., 2010). Por outro lado, os miRNAs também podem ter como alvo mRNAs de citocinas inflamatórias. Por exemplo, a superexpressão do miR-146a, miR-155 e miR-9 modulam a sinalização do receptor de IL-1 (IL-1R), como resultado da direta inibição de IRAK1 e TRAF6 pelo miR-146a, da ligação de TAB2 por miR-155 e o da subunidade p50 do NF $\kappa$ B pelo miR-9 (Figura 11). A sinalização induzida por IL-6 pode ser modulada através da repressão de SOCS1 pelo miR-155, como descrito anteriormente. Os miRNAs também podem competir com proteínas de ligação ao RNA para proteger a estabilidade do mRNA.

Um exemplo seria o papel do miR-155 na estabilização por ligação ao mRNA do TNF $\alpha$ , enquanto o miR-125b tem um importante papel na desestabilização deste alvo (TILI et al., 2007). O miR-132 age inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por TLR. Pesquisas mostraram que a indução de miR-132 mediada por herpes vírus associado a sarcoma de Kaposi em células endoteliais linfáticas prejudica a expressão de genes antivirais, como IFN- $\beta$ . O miR-132 maduro liga-se à 3'UTR mRNA p300 e reduz expressão de p300. Isso causa a atenuação da transcrição de genes com elementos responsivos ao interferon ou  $\kappa$ B em seus promotores (ISRE ou  $\kappa$ B RE), regulando a resposta antiviral inibindo a transcrição de genes inflamatórios e facilitando a expressão gênica viral (LAGOS et al., 2010).



**Figura 11. Controle de citocinas induzidas por TLRs e sinalização de IL-1 mediado por miRNAs.** A superexpressão do miR-146a, miR-155 e miR-9 modula a sinalização do receptor IL-1 (IL-1R), que pode ser o resultado do direcionamento direto de IRAK1 e TRAF6 por miR-146a, o direcionamento da proteína TAB2 por miR-155 e/ou o direcionamento da subunidade p50 do NF- $\kappa$ B pelo miR-9. I $\kappa$ B, inibidor de NF- $\kappa$ B. **Adaptado de O'Neill; Sheedy; McCoy, 2011.**

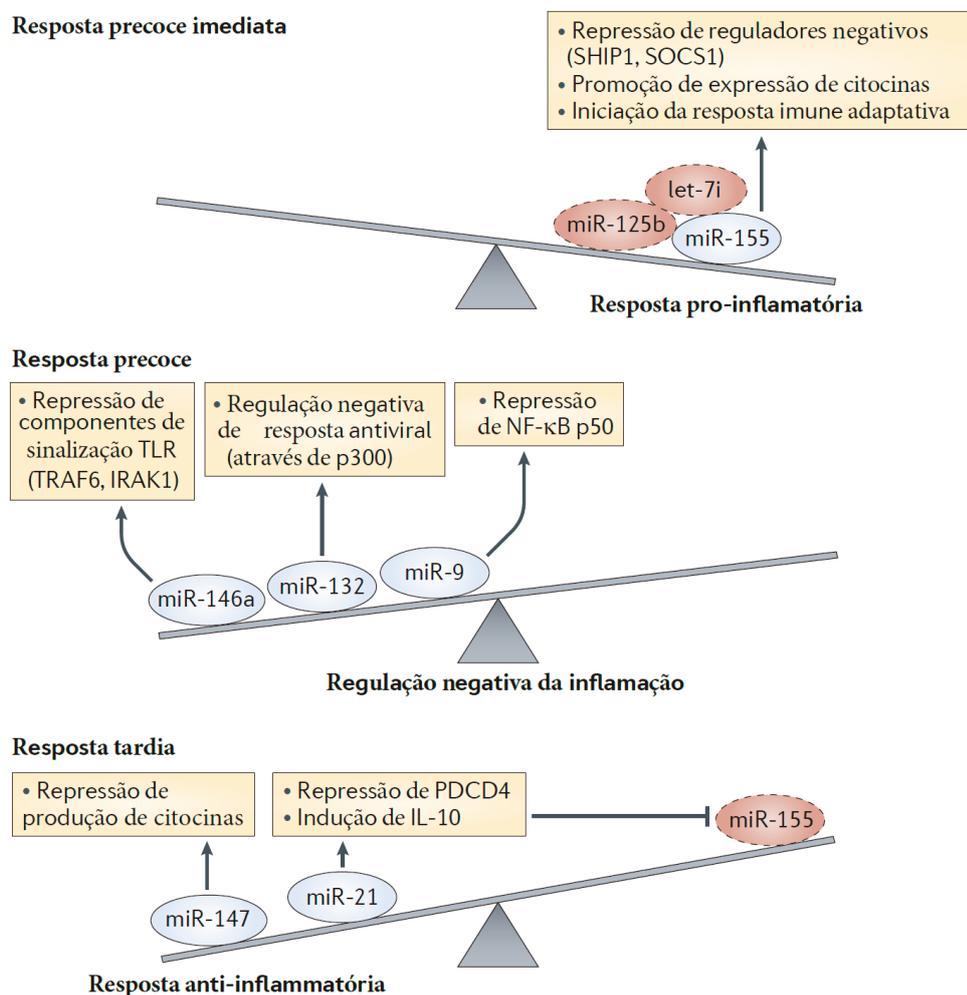
### 1.2.1 microRNAs e a Resolução da Inflamação via TLR

Estudos sugerem que a ativação da expressão de miRNAs na resposta imune às infecções microbianas esteja vinculada ao reconhecimento dos patógenos pelos TLRs. Tal reconhecimento inicia uma via de transdução de sinal que culmina com o aumento da expressão de genes dependentes do fator de transcrição NFκB (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011).

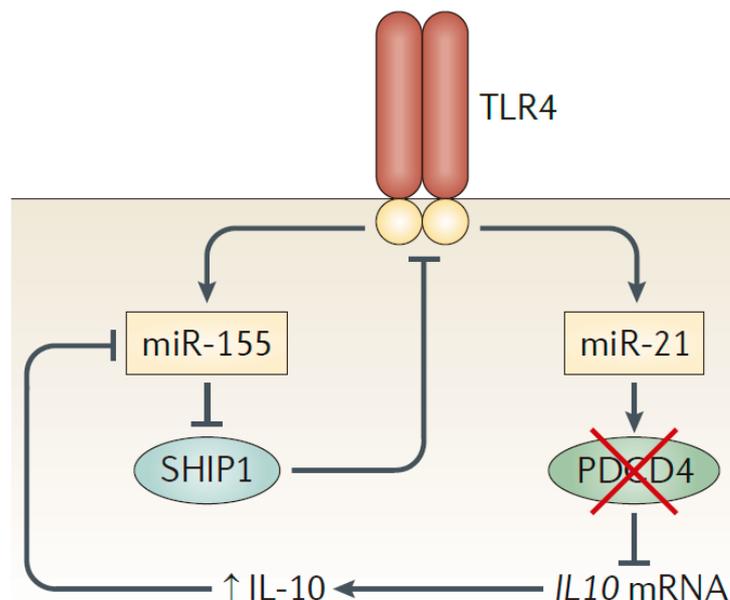
A via do NFκB ativa a transcrição de miRNAs que se ligam à região 3'UTR do mRNA de genes de citocinas e de moléculas adaptadoras da via de sinalização ativada pelo TLR, inibindo assim a síntese de tais proteínas. Os miRNAs induzidos por TLRs ativados após infecção viral, têm um papel importante na regulação da resposta imunológica, de modo a prevenir uma resposta inflamatória excessiva que poderia causar danos teciduais ao hospedeiro, como já ilustrado na Figura 8 (EULALIO et al., 2012). O que é interessante com relação às moléculas de sinalização de TLR que são alvos de miRNAs é que relativamente poucas proteínas foram confirmadas como alvos diretos de miRNAs. No entanto, essas proteínas são componentes de várias vias de sinalização de TLR, o que indica que uma vez que um TLR é acionado, o direcionamento de proteínas comuns de sinalização mediadas por miRNA poderia silenciar a sinalização através de múltiplos TLRs. Como a maioria dos patógenos pode envolver vários TLRs, os miRNAs podem ajudar a evitar respostas pró-inflamatórias excessivas após a exposição ao patógeno, interrompendo várias vias de TLR. É provável que os miRNAs trabalhem em conjunto com vários outros mecanismos para controlar a expressão de componentes de sinalização de TLR. A combinação destes mecanismos pode resultar na redução e terminação oportuna da resposta pró-inflamatória (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011).

Uma resposta pró-inflamatória inicial pode ser mediada pela indução precoce da expressão do miR-155 via TLR, limitando ou inibindo a expressão dos principais reguladores negativos da sinalização TLR e assim, promovendo a expressão de citocinas. Além disso, let-7i e miR-125b são regulados negativamente no início da resposta imune para permitir a produção dos mediadores pró-inflamatórios TLR4 e TNFα, respectivamente. A posterior indução do miR-146a regula negativamente a resposta imune inata, desativando as vias de sinalização de TLR (Figura 12). Posteriormente, o miR-21 é induzido a promover um efeito anti-inflamatório, facilitando a produção de IL-10, que por sua vez pode inibir a

expressão do miR-155, contribuindo assim para um efeito anti-inflamatório (Figura 13) (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011).



**Figura 12. Papel dos miRNAs na resolução da inflamação desencadeada pelo sTLRs.** A ativação dos TLRs resulta na indução sequencial de importantes miRNAs que controlam a intensidade e duração de uma resposta inflamatória. A sinalização TLRm induz fortemente a expressão do miR-155, o qual aumenta a resposta inflamatória através da inibição de reguladores negativos, como SHIP1 e SOCS1. A diminuição do miRNA let-7i e miR-125b poderiam contribuir para este efeito devido à falta de repressão dos respectivos TLR4 e TNF. Posteriormente, a indução do miR-146a e miR-9 resolve a resposta pró-inflamatória, inibindo TRAF6 e IRAK1, que são componentes-chave das vias de sinalização de TLR, e a subunidade nuclear p-kB (NF-κB) subunidade p50, respectivamente. A expressão miR-132 também demonstrou estar aumentada pela sinalização de TLR e limitaria a resposta antiviral por inibição da p300. Posteriormente, o miR-21 é induzido e aumenta a expressão de IL-10 reprimindo a morte celular programada 4 (PDCD4), o que pode contribuir para a indução de uma resposta anti-inflamatória através da inibição do miR-155. miR-147 também promove uma resposta anti-inflamatória, reprimindo a produção de citocinas. Adaptado de O'Neill; Sheedy; Mccoy, 2011.



**Figura 13. Ajuste fino da sinalização de TLR4 pelos miR-155 e miR-21.** A sinalização de TLR4 aumenta os níveis de miR-155, o que leva à degradação de SHIP1, um regulador negativo da sinalização deste receptor. No entanto, a ativação de TLR4 também aumenta o nível de miR-21, que tem como alvo o mRNA que codifica a morte celular programada 4 (PDCD4), que é um inibidor da tradução de IL10. A IL-10, então, se alimenta novamente na via e inibe especificamente a indução do miR-155. Isso, por sua vez, leva a um aumento de SHIP1 e à inibição da sinalização do TLR4. Este processo pode ser importante para o efeito inibidor da IL-10 na sinalização de TLR e pode ser relevante para tolerância a LPS ou para a resolução de respostas inflamatórias induzidas por TLR4. **Adaptado de O'Neill; Sheedy; Mccoy, 2011.**

### 1.2.2 miRNAs nas Infecções por Flavivírus

Os miR-155, miR-29b e miR-146a foram envolvidos na produção de citocinas inflamatórias e supressão da resposta imune inata na micróglia após a infecção por JEV (IYER et al., 2012; SOLOMON, 2003). Por outro lado, o miRNA-15b mostrou desempenhar um papel na regulação da expressão citocinas em astrócitos e micróglia induzidos pelo JEV, sugerindo que os astrócitos são tão importantes quanto as micróglias na regulação da inflamação induzida pela infecção do JEV (LANNES; SUMMERFIELD; FILGUEIRA, 2017). Também foram identificados os miR-181 e miR-146a sendo secretados por astrócitos e envolvidos na resposta inflamatória (IYER et al., 2012). Recentemente, foi observado que na infecção pelo JEV, ocorre o envolvimento do microRNA-19b-3p na regulação da resposta inflamatória de células neuronais, o que leva ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e CCL5. Esta resposta inflamatória foi relacionada à astrogliose, microgliose e morte de neurônios (ASHRAF et al., 2016).

Embora grandes avanços venham sendo descritos quanto à identificação de miRNAs

importantes na regulação da resposta imune às infecções bacterianas e virais, não existem relatos sobre o papel destes pequenos RNAs regulatórios na resposta imune inata pró-inflamatória por parte de células da micróglia infectadas pelo ZIKV (BI; LIU; YANG, 2009).

## **2. Relevância da Pesquisa**

Nos últimos anos, o surgimento, ou ressurgimento, de diferentes arboviroses gerou um alerta global. Um exemplo é o ZIKV, que em 2015 ocasionou um surto epidêmico no Brasil, o qual se propagou para outros países da América atingindo mais de 1,5 milhão de casos, o que levou a OMS declarar emergência de saúde pública global em fevereiro de 2016 (WHO, 2017). Os primeiros estudos em cérebros de recém-nascidos expostos ao ZIKV no período pré-natal mostraram consequências devastadoras, incluindo microcefalia, hidrocefalia, necrose, calcificação periventricular e cortical, astrogliose difusa e ativação da micróglia, conhecida como síndrome congênita do Zika (SCZ) (BRITO, 2016). A SCZ ocorre em 6% a 12% dos casos de gestantes infectadas pelo ZIKV, o que sugere que outros fatores de suscetibilidade podem estar envolvidos. Dentro deste contexto, um estudo molecular mais aprofundado se faz necessário para esclarecer o papel da micróglia nas neuropatologias observadas na infecção pelas diferentes cepas do ZIKV. Demonstraram o envolvimento dessas células e miRNAs em processos neuroinflamatórios desencadeados por infecções virais, como a JEV, como sendo os principais reguladores da neuroinflamação (ALVAREZ-GARCIA, 2005; CROCE; CALIN, 2005; HAMMOND, 2006). Assim, a identificação de miRNAs envolvidos na interação patógeno-hospedeiro mostra-se relevante para o entendimento das bases moleculares da resposta do hospedeiro à infecção e é essencial para o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune às infecções virais e patogênese.

## **3. Objetivos**

Estudar a expressão diferencial de microRNAs e seus respectivos alvos nos mecanismos moleculares e imunoinflamatórios relacionados à infecção de células da micróglia - BV2 – por isolados da cepa africana e asiática do vírus da Zika.

### **3.1. Objetivos específicos**

- a. Produzir vírus infeccioso das linhagens ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub>;
- b. Infectar células de micróglia da linhagem BV-2 com ZIKV e avaliar a citotoxicidade;

- c. Analisar a cinética de replicação das linhagens ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> em BV2;
- d. Avaliar a expressão de marcadores de ativação de células BV2 em resposta à infecção por ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> comparando com as não infectadas;
- e. Analisar a expressão dos miR-155, miR-146a, miR-132, miR-125b e seus alvos nas células infectadas com ZIKV;

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Cultura de células

Linhagem celular de micróglia de cérebro de camundongo C57BL/6, BV2, foi comprada do Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ 0356, lote 001228). As células são semi-aderentes cultivadas em meio RPMI-1640 (LGC, código: BR30255-05), acrescido de L-Glutamina 2,05 mM, hepes 25 mM, bicarbonato de sódio 2 g/L e 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, código: 12657-029), pH 7,4.

Células C6/36 (linhagem celular de glândula da larva do mosquito *Aedes albopictus*), gentilmente cedidas pelo Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Instituto de Biologia, UnB), foram cultivadas em meio TC-100 (Vitrocell Embriolife, lote 005/16) acrescido de bicarbonato de sódio, L-glutamina, antibiótico, antimicótico, triptose Broth e 5% de SFB, pH 7,3.

Células Vero (linhagem celular de epitélio de rim de macaco verde africano) foram mantidas em meio DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco, código 31600-026) suplementado com L-glutamina, piruvato de sódio, 2,5% de hepes, 5% de SFB e 1% penicilina- estreptomicina, pH 7,2.

Todas as células foram mantidas em estufa úmida a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>, com exceção das C6/36, que foram mantidas em incubadora a 28°C sem CO<sub>2</sub>.

### 4.2. Manutenção e propagação do vírus Zika

Foram utilizados ZIKV provenientes de duas linhagens distintas, da cepa de referência africana isolado de macaco - ZIKV<sub>MR766</sub> (ATCC VR1838) - e um isolado humano brasileiro de Pernambuco - ZIKV<sub>PE243</sub> (KX197192) -, gentilmente cedidos pela Dra. Luciana Barros de Arruda (Instituto de Microbiologia, UFRJ). Para propagação viral, células C6/36 ou Vero foram plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> *overnight* até atingirem 70% de confluência. As células foram, então, incubadas com os vírus em

multiplicidade de infecção (MOI) 0,01 em 5 mL de meio TC-100 ou DMEM sem SFB. Após 2h de adsorção viral foi acrescentado 10 mL de meio TC-100 com 2% de SFB (C6/36) ou 10 mL de meio DMEM com 2% de SFB (Vero). As células foram mantidas a 28°C (C6/36) ou 37°C (Vero). Após sete dias de infecção, os sobrenadantes das células foram coletados e centrifugados, os pellets foram descartados, os vírus foram concentrados e filtrados em filtro de 0,22 µm, e, finalmente, aliquotados e armazenados a -80°C. Os títulos dos vírus estoque foram determinados por ensaio de placa de lise em células Vero (COELHO et al., 2017).

### **4.3. Titulação viral por ensaio de placa de lise (PFU)**

Foram plaqueadas  $4 \times 10^4$  células Vero por poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, se as células apresentassem 70% de confluência, prosseguia-se com o ensaio. Em seguida, as células foram cultivadas com diluições seriadas das amostras de ZIKV, em meio DMEM sem SFB. Após 2h de incubação sob leve agitação, os poços foram lavados com PBS, e o meio da infecção foi substituído por meio DMEM com 1,5% de carboxi-metil-celulose (CMC – ThermoFisher) e 1% de SFB. As placas foram, então, incubadas por 5 dias a 37°C. Após esse período, as células foram fixadas com formaldeído 10% *overnight* e coradas com cristal violeta 1%, diluído em metanol a 20%, por 5 min. As placas de lise formadas foram contadas e o resultado expresso em log de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL) (CONTRERAS; ARUMUGASWAMI, 2016).

### **4.4. Infecção de BV2 com ZIKV**

Células BV2 foram plaqueadas, em duplicata, em placas de 6 poços, na concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte se as células apresentassem 70% de confluência prosseguia-se com o ensaio. Para manter o mesmo número de células, o sobrenadante é coletado e centrifugado, para reutilizar o pellet. As células foram lavadas com PBS e infectadas com os vírus ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>, em MOI de 1, diluídos em apenas 600 µL de meio RPMI sem soro para aumentar o contato entre célula e vírus. Como controle, as células de um par de poços foram cultivadas com a mesma quantidade de meio de cultura sem soro. As placas foram incubadas por 2h a 37°C com leve agitação a cada 15 minutos para evitar que alguma parte do poço seque. Após a incubação, o meio com vírus é substituído por meio suplementado com 5% de SFB. As células são coletadas com 24, 48 e 72 horas pós infecção (p.i.). Como controle positivo de inflamação, as

células são submetidas a 18 horas de tratamento com LPS [0,1 mg/mL] e em contato com ATP a 1 mM nos últimos 30 minutos.

#### **4.5. Ensaio de viabilidade celular utilizando o teste de XTT**

BV2 foram plaqueadas em placa de 96 poços, em triplicata, em uma concentração de  $10^4$  células por poço, infectadas com ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>, como descrito anteriormente, em MOI de 0,1, 1 e 5. Foi utilizado como controle negativo, células tratadas com meio de cultura RPMI sem SFB, designadas como “meio”, e tratadas com sobrenadante de células C6/36 não infectadas, chamadas de “mock”. Nos tempos de 1 a 7 dias após a infecção, as células foram diariamente incubadas com solução de 2,3-Bis-(2-metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT) (Sigma-Aldrich) e Phenazine methosulfate (PMS) (Sigma-Aldrich) por 2 a 4 horas em estufa a 37°C. A metabolização foi avaliada no espectrofotômetro (SpectraMax) a 450 nm de densidade ótica (OD). Como controle positivo de morte, foi usado tratamento com 1% de Triton X100.

#### **4.6. Avaliação da replicação viral**

BV2 foram infectadas com os vírus ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>. Após o período de adsorção do vírus, um poço foi lavado com meio, que foi armazenado a -80°C e processado junto com as amostras para ser o controle de *input*, tempo 0 de infecção. A cinética de replicação viral em BV2 foi avaliada por RT-qPCR, nos tempos de 0, 8, 16, 24, 48 e 96 horas p.i., e ensaio de placa de lise, com os sobrenadantes dos tempos de 0, 16, 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas p.i.. Para análise de RNA viral intra e extracelular, extrato de células e sobrenadantes foram recolhidos para realizar a extração do RNA total pelo reagente LS TRIzol (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. Para realizar o ensaio de transcrição reversa (RT PCR) do RNA, foram utilizados 7,1 µL do RNA total obtido do sobrenadante. A concentração de RNA extraído do pellet foi quantificada e normalizada para uma quantidade entre 1-2 µg, de acordo com as recomendações do fabricante. Esse material foi misturado a 2,9 µL do mix do kit High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems), que utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos, seguindo o protocolo do fabricante, o qual segue os seguintes parâmetros no termociclador (Bio-Rad): 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C. Posteriormente, 5 µL do DNA complementar (cDNA) obtido foi submetido à PCR

quantitativa em tempo real (qPCR) para quantificação do RNA utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto para ambos os vírus. Foi utilizada uma curva padrão com diferentes concentrações de PFU para determinar a concentração equivalente de RNA. Os valores obtidos foram normalizados a partir da divisão pelos valores de *input*. Os primers utilizados estão descritos no quadro 1. Para análise da concentração de vírus infeccioso, os sobrenadantes recolhidos das infecções com vírus ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> foram utilizados no ensaio de titulação por placa de lise de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

#### **4.7. Quantificação da expressão de microRNAs e mediadores inflamatórios em BV2 infectadas por ZIKV**

BV2 foram plaqueadas em placa de 6 poços, em uma concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço, e infectadas com ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>, como descrito anteriormente. Após 24, 48 e 72 horas, o extrato celular foi recolhido para extração de miRNA e mRNA com o kit mirVana PARIS (Protein and RNA Isolation System - Invitrogen, código AM1556), que separa os miRNAs dos RNAs >200nt da amostra, e ambos são eluídos em água livre de nucleasse e de inibidores de PCR. Para garantir uma ótima performance do ensaio, as amostras de mRNA extraídas foram corridas em gel de agarose livre de RNase para garantir que estavam íntegras e não contaminadas com DNA, e esse resultado é extrapolado para o seu correspondente miRNA. A concentração de mRNA e miRNA extraídos do pellet foi quantificada no fluorímetro Quantus (Promega) e normalizada para uma quantidade de 2 µg para mRNA e 10 ng para miRNA, de acordo com as recomendações do fabricante.

O mRNA foi misturado a 5,8µL do mix do kit High-Capacity cDNA (Applied Biosystems), que utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos, seguindo o protocolo do fabricante como descrito anteriormente. O cDNA obtido foi diluído 20x e 1 µL da diluição foi submetida à qPCR. Para quantificar a expressão de transcrição de IFN-β, IFN-γ, TNF-α, SHIP1, SOCS1, IRAK1, TRAF6, IL-6, IL-10 e CD68 foi utilizado o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg

e 60°C por 1 min, seguido de 95°C por 15 seg. Para o ensaio, foram utilizados os primers descritos no quadro 1 e os que lá não constam, são primers comerciais. A quantificação de HPRT1 foi utilizada para padronizar a quantidade de células extraídas por ser um controle endógeno de expressão celular. Os valores de expressão relativa dos alvos em células infectadas foram normalizados a partir dos valores atingidos pelo controle endógeno celular (HPRT1) e pelo controle negativo de infecção (mock) por cálculo de  $\Delta\Delta CT$ , corrigido com o valor da eficiência (PFAFFL, 2001).

Já o miRNA foi misturado a 7  $\mu$ L do mix TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), que não utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos. Por isso, cada amostra é submetida a uma reação de transcrição reversa com primers específicos do microRNA que se deseja quantificar. Para a RT-PCR, segue os seguintes parâmetros no termociclador: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C. Posteriormente, 1  $\mu$ L do cDNA obtido foi submetido à qPCR utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Analisou-se os miRNAs miR-125b, miR-132, miR-146a e miR-155. Todos os valores obtidos de expressão gênica foram normalizados a partir dos valores adquiridos do pequeno RNA nuclear endógeno U6 e controle negativo de infecção (mock) por cálculo de  $\Delta\Delta CT$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### **4.8. Análise Estatística**

A média e o desvio padrão foram calculados para cada situação experimental. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas usando a ferramenta de análise estatística do programa GraphPad Prism versão 5.0. Para todas as análises estatísticas os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

**Quadro 1.** Sequência de iniciadores e sonda utilizados para ensaio de PCR em tempo real.

Primer	Orientação	Sequência
1086	Senso	5'- CCGCTGCCCAACACAAG - 3'
ZIKV 1162c	Anti-senso	5' - CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT – 3'
1107	Sonda FAM	5'-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3'
HPRT1	Senso	5'- CCCTGGTTAAGCAGTACAGC – 3'
	Anti-senso	5'- ATCCAACAAAGTCTGGCCTG – 3'
IL-6	Senso	5'- AGCGACACTGGGGACTATTTA – 3'
	Anti-senso	5' – ACAGCCTTCGTGGTTGGAG – 3'
IFN- $\beta$	Senso	5' – TAGCACTGGCTGGAATGAGA - 3'
	Anti-senso	5' - TCCTTGGCCTTCAGGTAATG - 3'
IRAK 1	Senso	5' – ATCAGGCTTTTTCCCAGGCTT – 3'
	Anti-senso	5' – CACCTGATGCCTTTGGGCTA – 3'
SOCS 1	Senso	5' – CTGCGGCTTCTATTGGGGAC – 3'
	Anti-senso	5' – AAAAGGCAGTCGAAGGTCTCG – 3'
TNF- $\alpha$	Senso	5' – CCTGTAGCCCACGTCGTAG – 3'
	Anti-senso	5' – GGGAGTAGACAAGGTACAACCC - 3'
TRAF 6	Senso	5' – AAGATTGGCAACTTTGGATG – 3'
	Anti-senso	5' – GTGGGATTGTGGGTTCGCTG – 3'

#### 4.9. Análise qualitativa de CD68, Iba-1 e MHC-II por imunocitoquímica

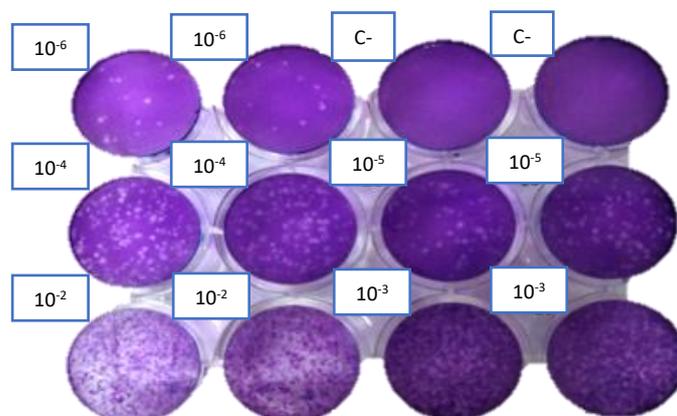
Células BV2 foram plaqueadas por triplicata em lamínulas de vidro na placa de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço. As células foram infectadas com ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>, MOI 1. Como controle negativo, as células foram cultivadas nas mesmas condições já descritas anteriormente, já o controle positivo foi acrescido apenas de LPS. Para toda placa ser fixada no mesmo dia, foi feita a infecção em tempo reverso, ou seja, infectamos a placa por três dias consecutivos. Assim, ao final do último dia, obteve-se poços com células infectadas a 24, 48 e 72 horas. Toda a placa foi lavada delicadamente com PBS aquecido a 37°C e todos os poços foram fixados com paraformaldeído (PFA) a 4% a temperatura ambiente *overnight*. As células foram permeabilizadas durante 4 min em PBS com 0,2% Triton X-100 e bloqueadas durante 30 min com 3% de BSA (Invitrogen) em PBS. Depois, as células foram incubadas *overnight*

com os anticorpos primários anti-Iba1 (Wako, código 019-19741, produzido em coelho) diluído 1:1000, anti-CD68 (Bio-Rad, MCA1957, produzido em rato) diluído 1:100 e com anti-MHC II conjugado com PE (amarelo) (eBioscience, ref. 12-5322-81) diluído 1:1000. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos secundários com fluorescência AlexaFluor488 (verde) e AlexaFluor647 (rosa). Todas as incubações foram seguidas por lavagem extensiva com PBS. Para corar os núcleos, usamos meio de montagem contendo 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (azul) (Vectashield - Vector Laboratories). A microscopia de fluorescência foi realizada toda ao mesmo tempo, com as mesmas soluções de anticorpo e todas as fotos foram tiradas com os mesmos ajustes do microscópio confocal Zeiss 710 equipado com uma objetiva de 63x e sistema de imagem digital (câmera Roper Scientific e software Zen Black).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Produção de ZIKV.

O ZIKV<sub>MR766</sub> replicou melhor em células de primatas Vero do que o isolado brasileiro, provavelmente refletindo a adaptação prévia do vírus a células de primatas não humanas. Já a infecção de células de mosquito C6/36 com o ZIKV<sub>PE243</sub> gerou a maior produção de progênes dentre todas as linhagens testadas. Com isso, o vírus brasileiro isolado em Pernambuco - ZIKV<sub>PE243</sub> (KX197192) – foi propagado em células C6/36. Já o vírus de referência africana - ZIKV<sub>MR766</sub> (ATCC VR1838) – foi produzido e titulado em células Vero. Os títulos obtidos foram  $6 \times 10^5$  PFU/mL, como ilustrado na Figura 14, e  $3,5 \times 10^7$  PFU/mL, respectivamente.



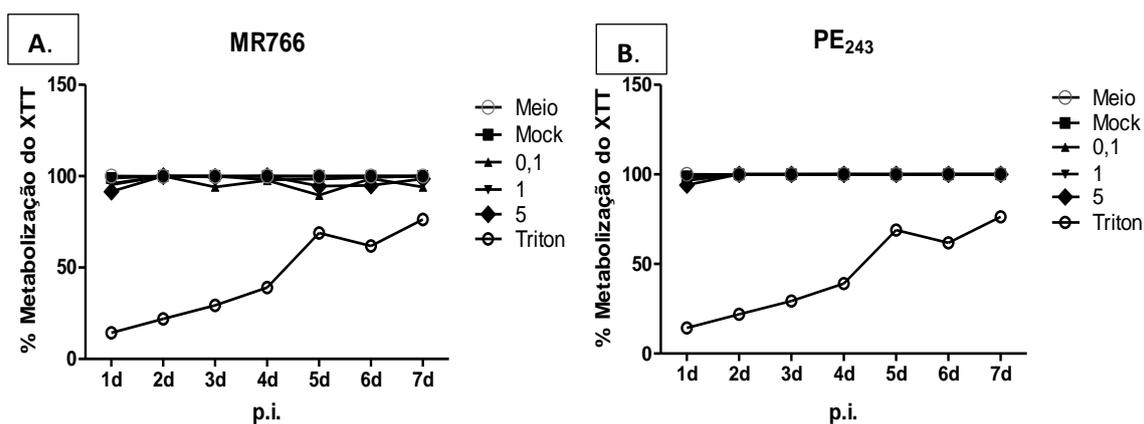
**Figura 14. Titulação do ZIKV por ensaio de placa de lise (PFU).** Imagem representativa de um ensaio em que células Vero foram infectadas por duplicata com diluições seriadas do ZIKV<sub>PE243</sub> ( $10^{-2}$ - $10^{-6}$ ). O controle negativo foi tratado com sobrenadante de C6/36 sem vírus. Após incubação de 5 dias, o meio semissólido imobiliza a partícula infecciosa e sua descendência

a infectar apenas as células vizinhas e formar placas de lise celular contáveis. As placas de lise são zonas com células destruídas pela infecção, e podem ser evidenciadas por coloração das células viáveis com corante cristal de violeta 1%, após a fixação com formaldeído 10% das células aderentes. O resultado é expresso em log de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL).

## 5.2. ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> não induzem citotoxicidade em células BV2.

Para investigar qual seria a dose infecciosa letal de até 50% das células e escolher a quantidade viral a ser utilizada nos experimentos seguintes, foi realizado o ensaio de metabolização de XTT. As células BV2 foram infectadas com ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI de 0,1, 1 e 5, incubadas com XTT diariamente por um período de 7 dias e a metabolização do substrato foi medida por leitura no espectrofotômetro.

Como pode ser observado na Figura 15, não foram encontradas diferenças significativas de morte nas BV2 infectadas com vírus de ambas as cepas entre os diferentes tempos e MOIs testados. Todas as leituras resultaram em aproximadamente 100% de metabolização do XTT, tanto em células infectadas, quanto nos controles negativos, designados como meio e mock. Como controle positivo, as células tiveram a morte induzida por triton X100 1%, as quais obtiveram a viabilidade consideravelmente reduzida de forma proporcional à quantidade de células. A Figura 15A ilustra os resultados de viabilidade de BV2 infectada com ZIKV<sub>MR766</sub>, enquanto a infecção por ZIKV<sub>PE243</sub> foi ilustrada na Figura 15B.



**Figura 15. Viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de XTT.** O teste de viabilidade celular foi realizado com MOIs de 0,1, 1 e 5, nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas pós infecção (1 a 7 dias p.i.) com o vírus da cepa africana ZIKV<sub>MR766</sub> (A.) e com da cepa asiática ZIKV<sub>PE243</sub> (B.). Os controles negativos foram designados como “meio” (RPMI) e “mock” (sup C6/36). O controle positivo teve a morte induzida por triton 1%. A porcentagem da viabilidade das células infectadas foi normalizada através da comparação das absorvâncias com o controle negativo meio.

Notavelmente, muitos relatos sugerem que o comprometimento da proliferação e morte celular está associado à infecção por ZIKV (LI et al., 2016a; TANG et al., 2016), enquanto outro relato sugere que ZIKV pobremente estimula a resposta imune e o efeito citopático em neuroprecursos humanos obtidos de tecido fetal. Esta falta de resposta imunológica forte permitiria que o ZIKV persistisse durante o desenvolvimento fetal e é consistente com a replicação observada ao longo de algumas semanas neste tecido (HANNERS et al., 2016). Essa diferença patogênica é evidenciada pela comparação das cepas em que mostra o ZIKV asiático replicando em níveis menores, porém por longos períodos, enquanto o africano infecta mais células, replica com maior título e gera mais morte celular. Esses achados são consistentes com as manifestações clínicas associadas, em que o primeiro tem a habilidade de gerar infecções crônicas, permitindo a continuação do desenvolvimento fetal com má formações e o segundo, gera respostas patogênicas agudas, resultando na interrupção da gestação (SIMONIN et al., 2016).

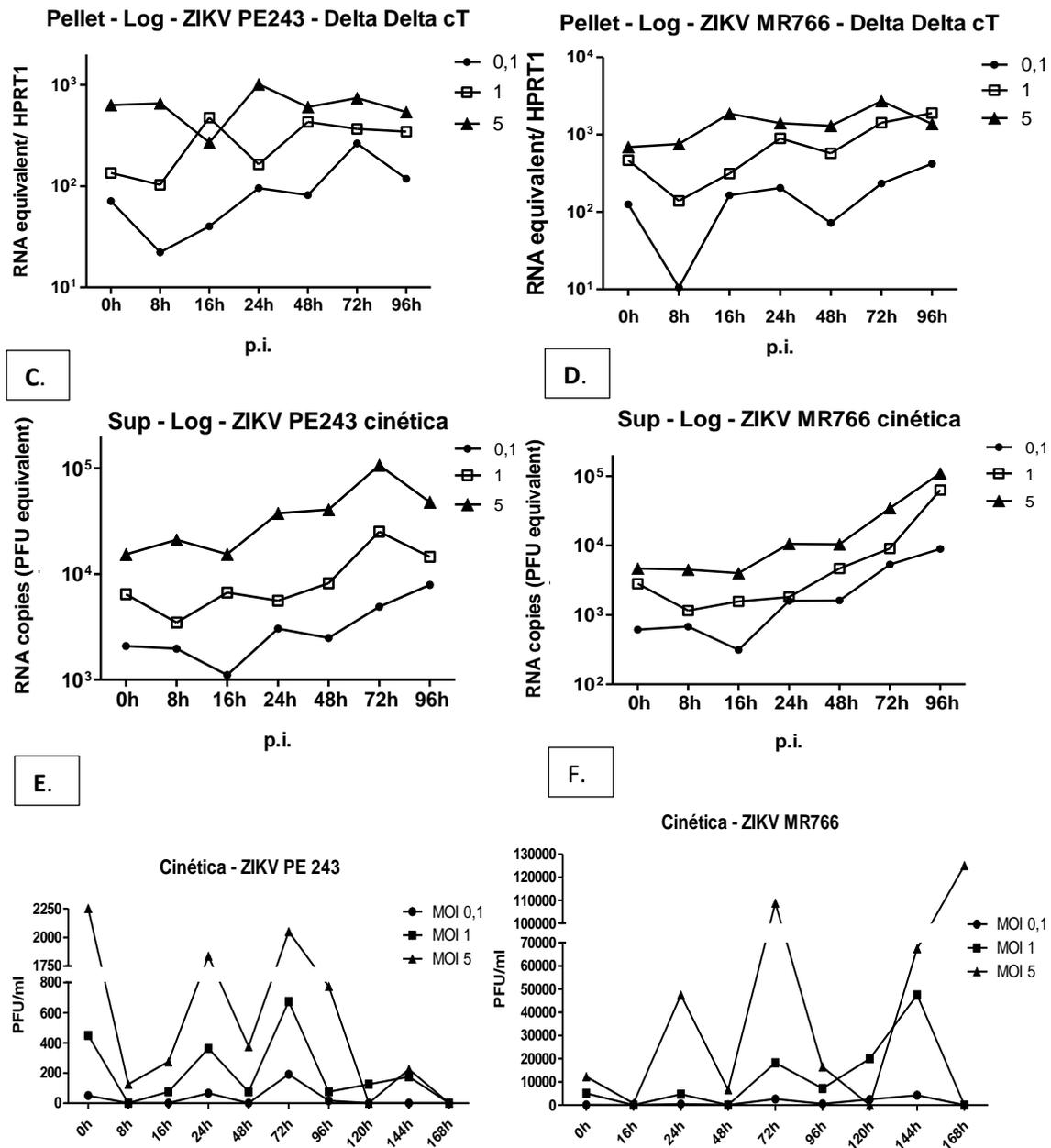
Nestes experimentos, não foi possível observar diferenças significativas no efeito citopatogênico pela infecção dos dois isolados. Em alguns casos, inclusive, foi detectada mais metabolização do XTT nas células infectadas que no mock, o que foi normalizado para 100%. O baixo efeito citopático pode se relacionar aos baixos níveis de infecção observados neste tipo celular, como mostrado na Figuras 16.

### **5.3. ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> não replicam de forma eficiente em BV2.**

Com o objetivo de avaliar se a linhagem celular de microglia-BV2 tem a capacidade de sustentar uma infecção produtiva, as células foram infectadas com os vírus ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>. A cinética de replicação viral intra e extracelular em BV2 foi avaliada por RT-qPCR, nos tempos de 0, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas p.i. (Figura 16 A-D). Visto o tardio aumento de cópias de RNA no sobrenadante, principalmente para o ZIKV<sub>MR766</sub>, o ensaio de placa de lise foi feito com os sobrenadantes dos tempos de 0, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas p.i. (Figura 16 E-F).

A.

B.



**Figura 16. Cinética de avaliação da replicação do ZIKV em BV2.** Células BV2 foram infectadas com ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> em 3 MOIs distintos (0,1, 1 e 5). **A-D.** A cinética de replicação de ambos os isolados foi avaliada no pellet e no sobrenadante por RT-qPCR nos tempos de 0, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas p.i. Os resultados foram expressos em log da quantidade de cópias de RNA viral. **E-F.** A titulação viral de ambas as cepas foi realizada em célula Vero com sobrenadante de BV2 dos tempos de 0, 8, 16, 24, 48, 72, 144 e 168h p.i., dadas em PFU/mL.

Os experimentos de cinética de replicação viral demonstram que as células BV2 são permissivas à infecção por ZIKV e são capazes de produzir vírus infecciosos. O RNA detectado no pellet indica que o vírus foi capaz de chegar ao espaço intracelular. Já o RNA no sobrenadante (sup) evidencia que há vírus sendo produzido e liberado da célula. Finalmente, o ensaio de PFU mostra que o vírus produzido é capaz de infectar outros tipos de células. Tanto os experimentos de qPCR, quanto os de PFU mostram uma liberação

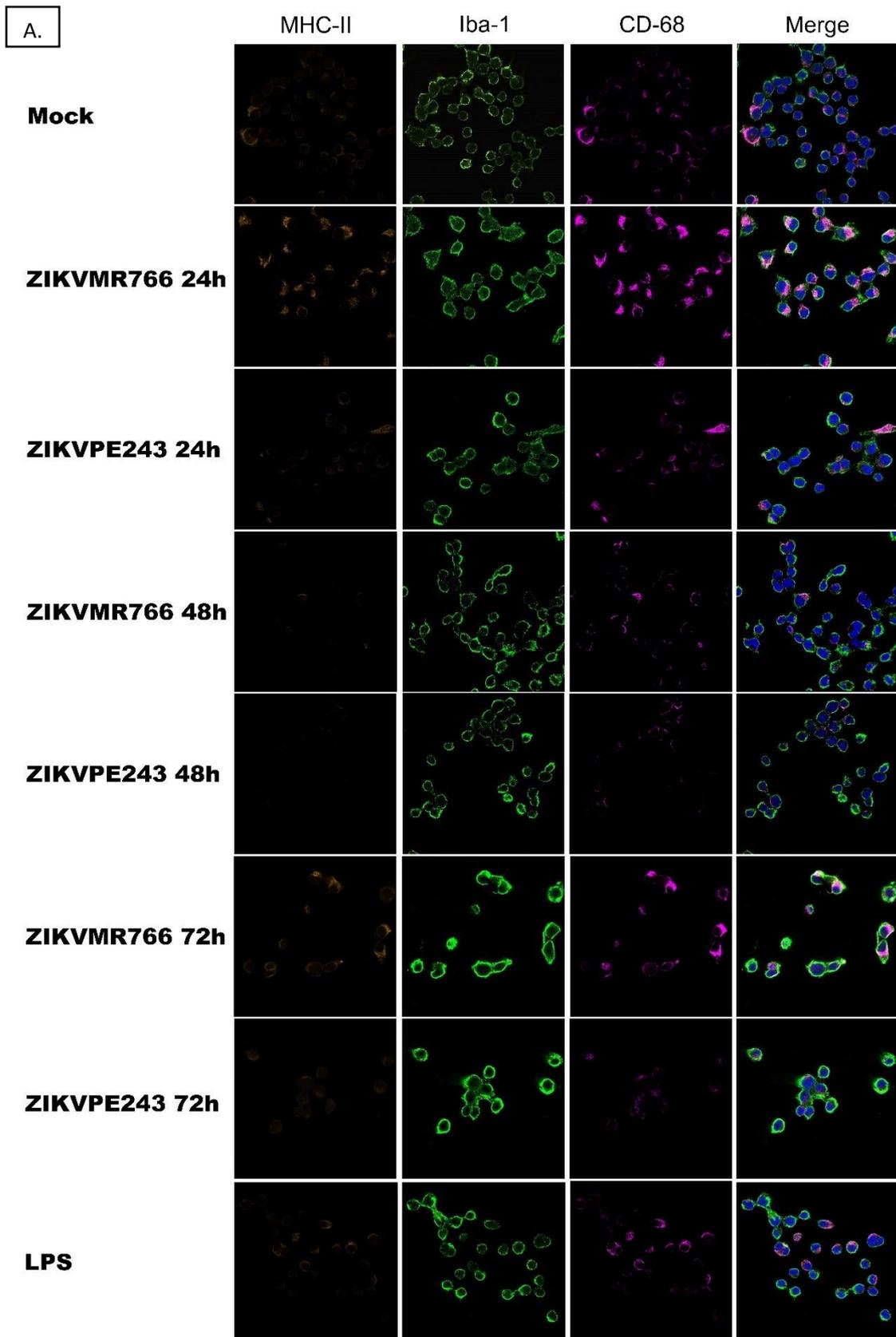
tardia de vírus, embora ambos os isolados apresentem picos de infectividade em 24 e 72h. Entretanto, é possível constatar que BV2 replica ZIKV<sub>PE243</sub> de forma menos eficiente que ZIKV<sub>MR766</sub>. Seria interessante investigar a possível causa da queda da infectividade em 48h, visto que não há queda também na produção de mRNAs virais no sobrenadante.

Os níveis de produção viral observados nestes experimentos foram menores (~2 logs) aos descritos por HBMECs de ambas as cepas (PAPA et al., 2017). Os resultados também contrastaram com os de células-tronco neuronais e organoides cerebrais, que foram capazes de produzir altos títulos virais gerando, conseqüentemente, alta taxa de morte celular (SIMONIN et al., 2017).

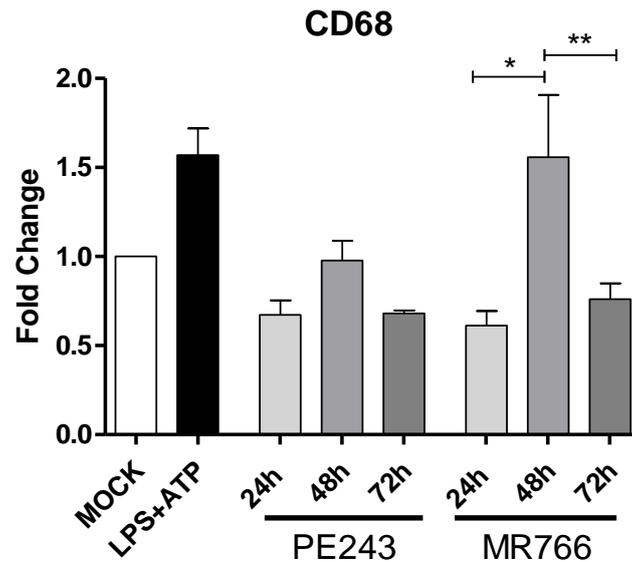
Outro estudo determinou se o estado hipomune de células progenitoras neurais humanas em resposta ao ZIKV impacta a replicação do vírus a longo prazo, monitorando a produção de vírus por 28 dias. Um aumento precoce foi detectado nos títulos virais 3 dias p.i., seguido por uma queda que coincide com o pico do efeito citopático. Os títulos atingiram o pico novamente no dia 7 e permaneceram até o dia 20, quando aumentaram ligeiramente durante o restante do tempo de 28 dias. Estes dados indicam que, após uma fase citotóxica inicial, o ZIKV estabelece uma infecção persistente neste modelo de cultura de hNPCs (HANNERS et al., 2016). Com isso, pode-se sugerir que a micróglia seja um reservatório neural de liberação viral, ainda que pouca, e de inflamação constante, uma vez que não há morte celular apesar da ativação, mostrada no experimento a seguir. Para confirmar essa hipótese, teria que se estender novamente os tempos estudados para encontrar o pico de liberação viral, assim como relatado na literatura.

#### **5.4. ZIKV<sub>PE243</sub> e ZIKV<sub>MR766</sub> induzem a expressão de marcadores de ativação em células BV2.**

Com o propósito de avaliar a possível ativação das células BV2 induzida por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub>, a expressão das moléculas Iba1, MHC-II e CD68, típicos marcadores de ativação de micróglia, foram analisadas por imunocitoquímica (figura 17A). Adicionalmente, a expressão de CD68 também foi avaliada pela técnica de qPCR (Figura 17B). Para isto, as células BV2 foram infectadas por ambos os isolados com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i. e comparadas com o controle negativo “mock” e positivo “LPS” para a imunocitoquímica, e “LPS+ATP” para a qPCR.



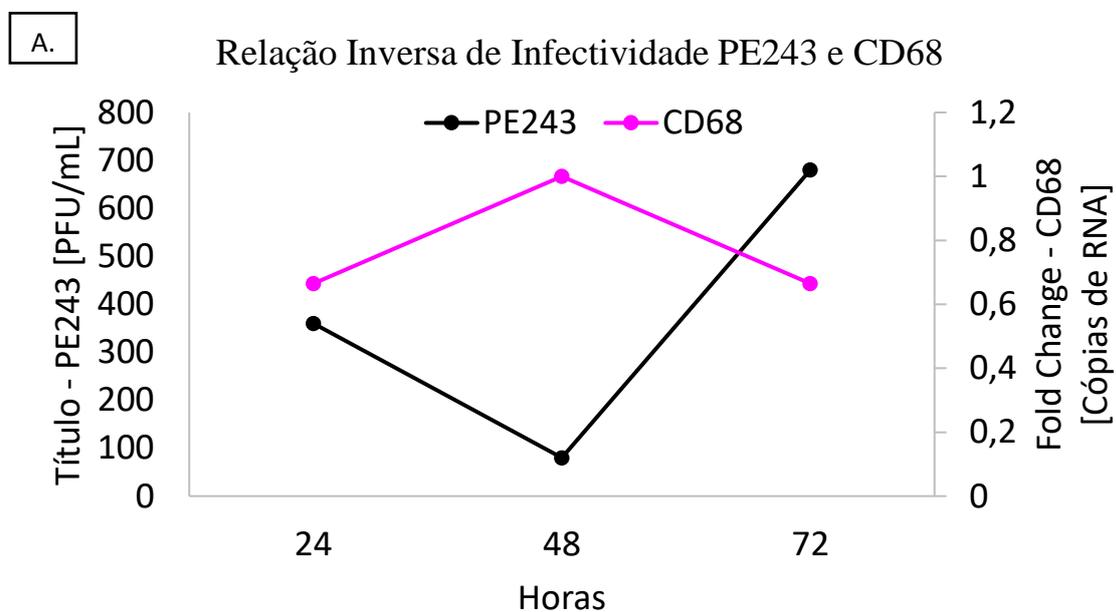
B.

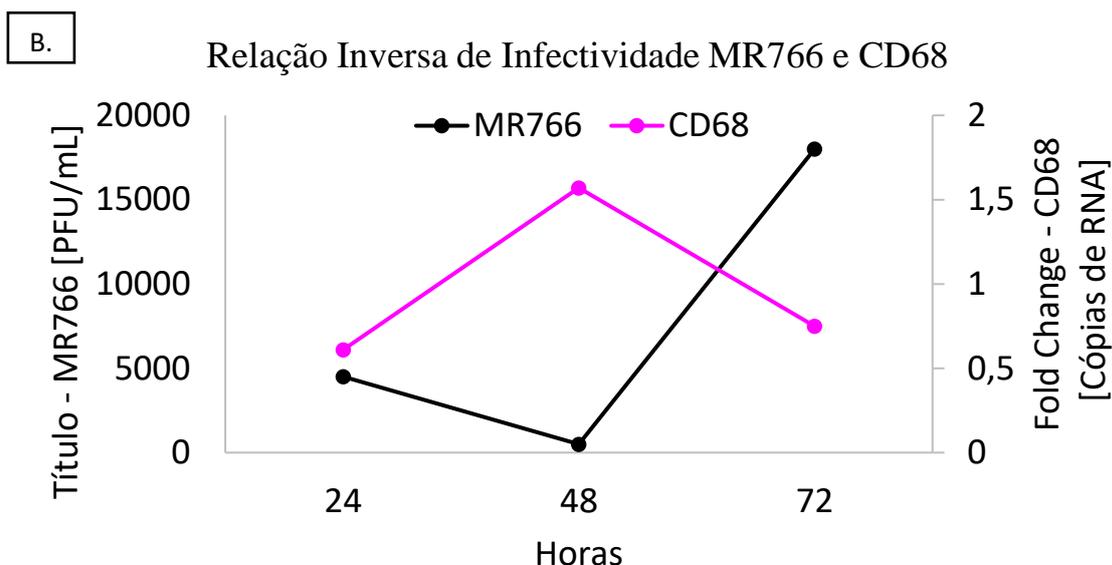


**Figura 17. Avaliação da ativação das células BV2 induzida por ZIKV.** Células BV2 foram infectadas por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i.. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS” para a imunocitoquímica e “LPS+ATP” para a qPCR. **A.** BV2 marcada com anti-MHC II conjugado com PE (amarelo), anti-Iba1 com AlexaFluor488 (verde), anti-CD68 com AlexaFluor647 (rosa) e marcador de núcleos DAPI (azul). A microscopia de fluorescência foi realizada toda ao mesmo tempo, com as mesmas soluções de anticorpo e todas as fotos foram tiradas com os mesmos ajustes do microscópio confocal. **B.** qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene CD68. Os resultados plotados do  $\Delta\Delta Ct$  foram normalizados em relação ao HPRT1 e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

Como pode ser observado na Figura 17A, ZIKV e LPS induzem, em células BV2, a expressão dos principais marcadores de ativação de micróglia (HENDRICKX et al., 2017). Entretanto, ZIKV<sub>MR766</sub> parece aumentar mais a expressão desses marcadores em comparação ao ZIKV<sub>PE243</sub>. Semi-quantitativamente, Iba1 parece ter o mesmo padrão de expressão em ambas as cepas e elevar os seus níveis de forma crescente com o tempo, enquanto MHC-II parece não ser induzida por ZIKV<sub>PE243</sub> quando comparado ao mock. O fato do ZIKV<sub>MR766</sub> ser mais infeccioso que ZIKV<sub>PE243</sub> pode explicar o fato de ter mais moléculas apresentadoras de antígenos, MHC-II. Percebe-se, também, que a expressão das proteínas CD68 não acompanha a transcrição do seu mRNA (Figura 17B). Embora o LPS sozinho não tenha efeito sobre o mRNA de CD68 em células BV2 (WONG et al., 2005), o tratamento com LPS e ATP teve um leve aumento não significativo em relação ao mock. Foi possível observar por qPCR uma modulação negativa na transcrição do marcador CD68 nas primeiras 24h e em 72h, enquanto há modulação positiva da proteína nestes tempos na imunocitoquímica. Esta discrepância pode se dever ao fato de que CD68 é expresso principalmente nas membranas lisossomais intracelulares, mas também na

membrana plasmática, e sofre regulação após um dado nível de expressão, o que poderia estar sendo detectado, talvez, o momento de expressão da proteína e o feedback negativo da transcrição. Outro fato que poderia ser investigado é sobre a via de mTOR, que, quando ativada, faz com que a micróglia aumente a expressão de genes lisossomais (ZHAO et al., 2018). A indução da transcrição de CD68, por exemplo, poderia ser uma consequência direta da sinalização alterada de mTOR. Entretanto, as proteínas não estruturais do ZIKV, NS4A e NS4B, suprimem sinergicamente a via Akt-mTOR (Figura 9), induzindo uma neurogênese defeituosa em NSCs fetais humanas (ROTHAN et al., 2019). Conseqüentemente, essa inibição pode atingir de alguma forma a expressão de CD68. Além de coincidir com os picos de infectividade do vírus (Figura 16 E-F), que pode explicar a inicial ativação das células e expressão elevada de CD68 na imunocitoquímica, a seguida inibição da transcrição do gene lisossomal pelo ZIKV em 24h, com a consequente queda da expressão da proteína em 48h. A baixa infectividade do vírus em 48h pode ter feito com que os níveis de transcrição de CD68 voltem a aumentar, significativamente em relação aos outros tempos no caso da infecção por ZIKV<sub>MR766</sub>, e o resultado disso pode ser observado com o aumento da tradução em 72h. O outro pico de infectividade viral em 72h se correlaciona, novamente, com a regulação negativa da transcrição de CD68 neste mesmo tempo, como comparado na Figura 18.

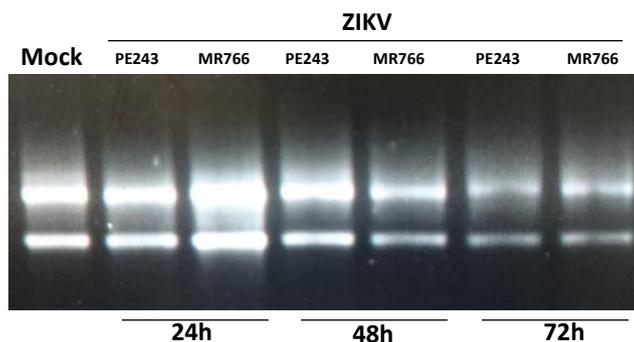




**Figura 18. Relação inversa entre título viral e cópias de RNA de CD68.** Eixo esquerdo e linha preta representam o título viral do **A.** ZIKV<sub>PE243</sub> e do **B.** ZIKV<sub>MR766</sub>. Eixo direito e linha rosa apresentam o nível de transcrição de CD68 na célula infectada em relação ao mock. Gráfico comparativo do pico de infectividade viral em 24 e 72 horas com o pico de transcrição de CD68 em 48 horas.

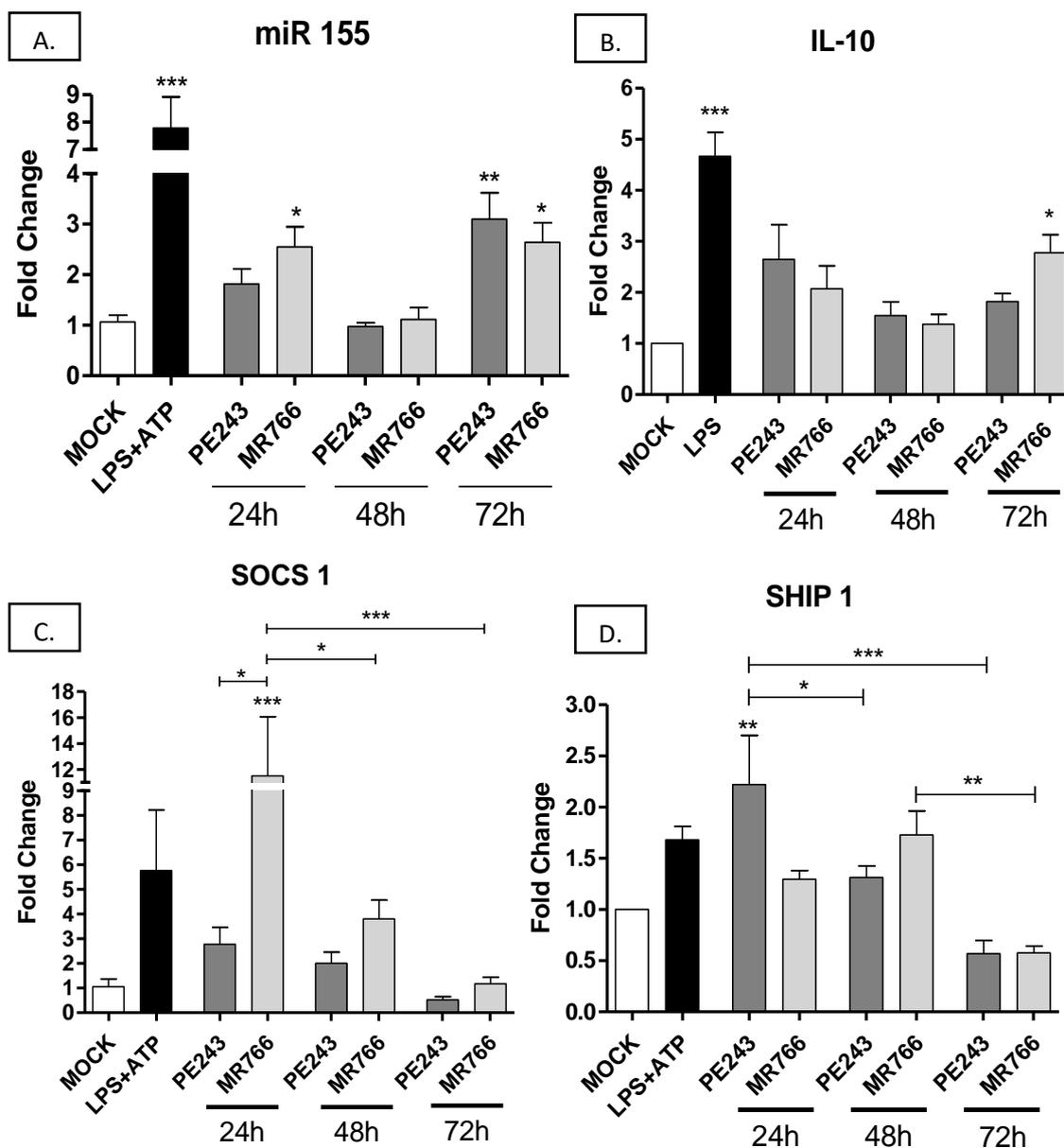
### 5.5. A infecção de ZIKV altera a expressão de microRNAs em células BV2.

Com a finalidade de medir os níveis de expressão dos microRNAs, BV2 foram infectadas com ou ZIKV<sub>MR766</sub> e 24, 48 e 72 horas p.i. os miRNA e mRNA foram extraídos. Primeiramente, para garantir a integridade e a pureza das amostras, estas foram corridas em gel de agarose livre de RNase, cujo resultado é extrapolado para o seu correspondente de miRNA, como na Figura 19.



**Figura 19. Teste de integridade do RNA.** 1  $\mu$ L de RNA total foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% livre de RNase. Imagem representativa de um ensaio em que são mostradas as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, sem bandas de DNA, indicando a integridade e pureza das amostras.

Após confirmar a integridade do RNA extraído, os miRNAs 155, 146a, 132 e 125b foram amplificados por qPCR após a infecção das células BV2 com isolados das cepas africana e asiática nos tempos de 24, 48 e 72h. Inicialmente, foi proposto trabalhar também com o miR-124, porém, curiosamente, não obtivemos amplificação nas nossas amostras, contrastando com dados da literatura (YANG et al., 2019). A figura 20, mostra a cinética de regulação da expressão do miR-155, da proteína SOCS1 - seu principal alvo, assim como da proteína SHIP1 e da citocina IL-10, correlacionadas na via regulatória do TLR4, como na figura 12.



**Figura 20.** Alteração da expressão do miR-155 e seus alvos SOCS1, SHIP1 e IL-10 em células BV2 pela infecção do ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i.. O controle negativo é “mock” e o

positivo, “LPS+ATP”. qPCR dos níveis de cópias de miRNAs e mRNA dos alvos. Os resultados plotados do  $\Delta\Delta C_t$  foram normalizados em relação ao HPRT1 e ao mock para os mRNAs, e em relação ao U6 e ao mock para os miRNAs. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  como diferença significativa, em relação ao mock quando não identificado pela barra.

Como esperado, foi possível observar um pronunciado aumento do miR-155 na presença do LPS - o controle positivo, em relação ao mock (>8 folds). Também foi verificado um aumento estaticamente significativo na infecção com ZIKV<sub>MR766</sub> no tempo de 24h p.i. em relação ao mock, enquanto nas células infectadas com ZIKV<sub>PE243</sub>, o aumento não foi significativo. Estes dados, provavelmente, indicam que a participação deste miRNA nas etapas iniciais da resposta inflamatória foi perdida e que já estamos observando a diminuição do aumento. Possivelmente, nos tempos analisados, a BV2 já está saindo do estado pró-inflamatório inicial e entrando no estado de transição sugerido na Figura 10, visto que o miR-146a (Figura 22A) já mostra aumento neste tempo. Além de, 48h após a infecção, ser verificada a diminuição da expressão deste miRNA nas células infectadas por ambos os isolados, sugerindo a ativação de um mecanismo de *feedback* negativo da resposta inflamatória, também pode estar relacionado com a queda na infecciosidade dos vírus liberados neste tempo pelas BV2 (Figura 16 E-F). Também é possível observar um expressivo aumento do miR-155 em 72h induzido por ambos os isolados (Figura 20A), se correlacionando com a possível reinfecção com o outro pico de infectividade neste tempo.

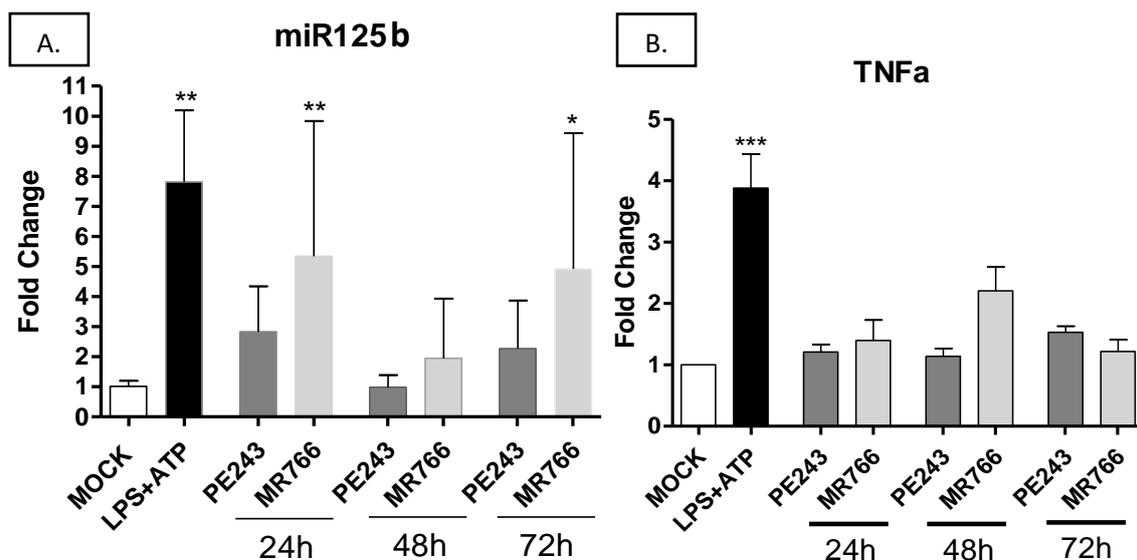
Ao analisar o alvo direto do miR-155, a proteína anti-inflamatória SOCS1, foi possível observar um aumento, não estatisticamente significativo, após tratamento com LPS em relação ao mock. Este resultado pode ser explicado novamente pela perda da fase pró-inflamatória da microglia, como demonstrado por Cardoso e colaboradores (CARDOSO et al., 2012) que observaram um aumento da expressão de SOCS1 entre 2 e 4h após o tratamento com LPS seguido por diminuição até 24h. Já ao analisar a expressão de SOCS1 nas células infectadas por ZIKV, é observado um aumento de SOCS1 24h após infecção (Figura 20C). Este aumento inicial pode obedecer a uma regulação positiva desencadeada pela interação do ZIKV com receptores TAM, os quais, após sofrer ativação pela ligação ao complexo vírus-Gas6/ProS, recrutariam o IFNAR para induzir a expressão de SOCS1/3, inibindo assim as respostas antivirais inatas e facilitando a replicação viral (Figura 5) (PERERA-LECOIN et al., 2014). Nesta mesma linha de raciocínio, o maior aumento induzido pelo ZIKV<sub>MR766</sub> em relação ao ZIKV<sub>PE243</sub> ( $p < 0,05$ ), poderia ser explicado pelas diferenças de patogenicidade entre as cepas, como descrito

anteriormente. O aumento inicial na expressão de SOCS1 é seguido por uma diminuição paulatina chegando a níveis menores que os basais à 72h, coincidindo com a maior expressão do miR-155.

Ao analisar o padrão de expressão da proteína SHIP1 (Figura 20D) é possível observar um modesto aumento, não significativo, na expressão desta proteína regulatória após tratamento com LPS. Este aumento poderia obedecer a participação desta proteína numa provável regulação negativa da ativação do TLR4, principal receptor envolvido na resposta à LPS (Figura 13). Ao analisar os níveis de expressão de SHIP1 em células infectadas pelo ZIKV, é possível observar um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) 24h após a infecção pelo ZIKV<sub>PE243</sub>, o qual se correlaciona inversamente com os níveis de expressão de miR-155. Entretanto, a repressão dos níveis de SHIP1 em 24h observada na infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub> se correlaciona com dados da literatura, em que 24h de infecção por JEV também regulou negativamente SHIP1 em células BV2 (THOUNAOJAM et al., 2014). Já os níveis de expressão deste gene diminuem marcadamente 72h após a infecção com ambos os isolados, confirmando a regulação repressiva deste miRNA.

Ao analisar o padrão de expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, é possível observar um aumento muito significativo ( $>5$  folds) após tratamento com LPS. Visto que esta interleucina imunossupressora inibe o miR-155, ao analisar os níveis de expressão em células infectadas pelo ZIKV<sub>MR766</sub>, é possível observar um aumento estatisticamente significativo em 72h (Figura 20B), o que se correlaciona com o começo de uma resposta anti-inflamatória tardia (Figura 12). Confirmando, no mesmo tempo, a correlação inversa de miR-155 com o ZIKV<sub>PE243</sub>. Provavelmente, por não ter níveis expressivos de IL-10 no tempo de 72h, além de outras vias, o miR-155 está elevado na infecção por ambas as cepas, conseguindo, conseqüentemente, inibir SHIP1 (Figura 13).

Um outro miRNA envolvido nos estágios iniciais da resposta imune, é o miR-125b. A expressão deste miRNA seria modulada para permitir a produção de mediadores pro-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ . A figura 21 mostra a cinética de expressão do miR-125b.



**Figura 21. Alteração da expressão do miR-125b e seu alvo TNF- $\alpha$  em células BV2 pela infecção do ZIKV.** Células BV2 foram infectadas por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i.. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS+ATP”. qPCR dos níveis de cópias de miRNAs e mRNA dos alvos. Os resultados plotados do  $\Delta\Delta C_t$  foram normalizados em relação ao HPRT1 e ao mock para os mRNAs, e em relação ao U6 e ao mock para os miRNAs. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  como diferença significativa, em relação ao mock quando não identificado pela barra.

É esperado que o miR-125b atinja o 3'UTR do TNF- $\alpha$ , sendo seu alvo direto. Vários estudos estabeleceram o TNF- $\alpha$  como sendo uma citocina crucial envolvida na resposta ao LPS, o que pode ser observado em nosso ensaio. Entretanto, podemos observar também um aumento do miR-125b em resposta a LPS e ATP. Estudos sugerem que os níveis do miR-125b poderiam aumentar em resposta ao LPS em células do sistema imune com objetivo de limitar a resposta inflamatória (TILI et al., 2007). Sendo assim, o grande aumento do TNF- $\alpha$  poderia estar induzindo, contraditoriamente, um aumento de expressão desse miRNA nas células da micróglia, que são os macrófagos do SNC.

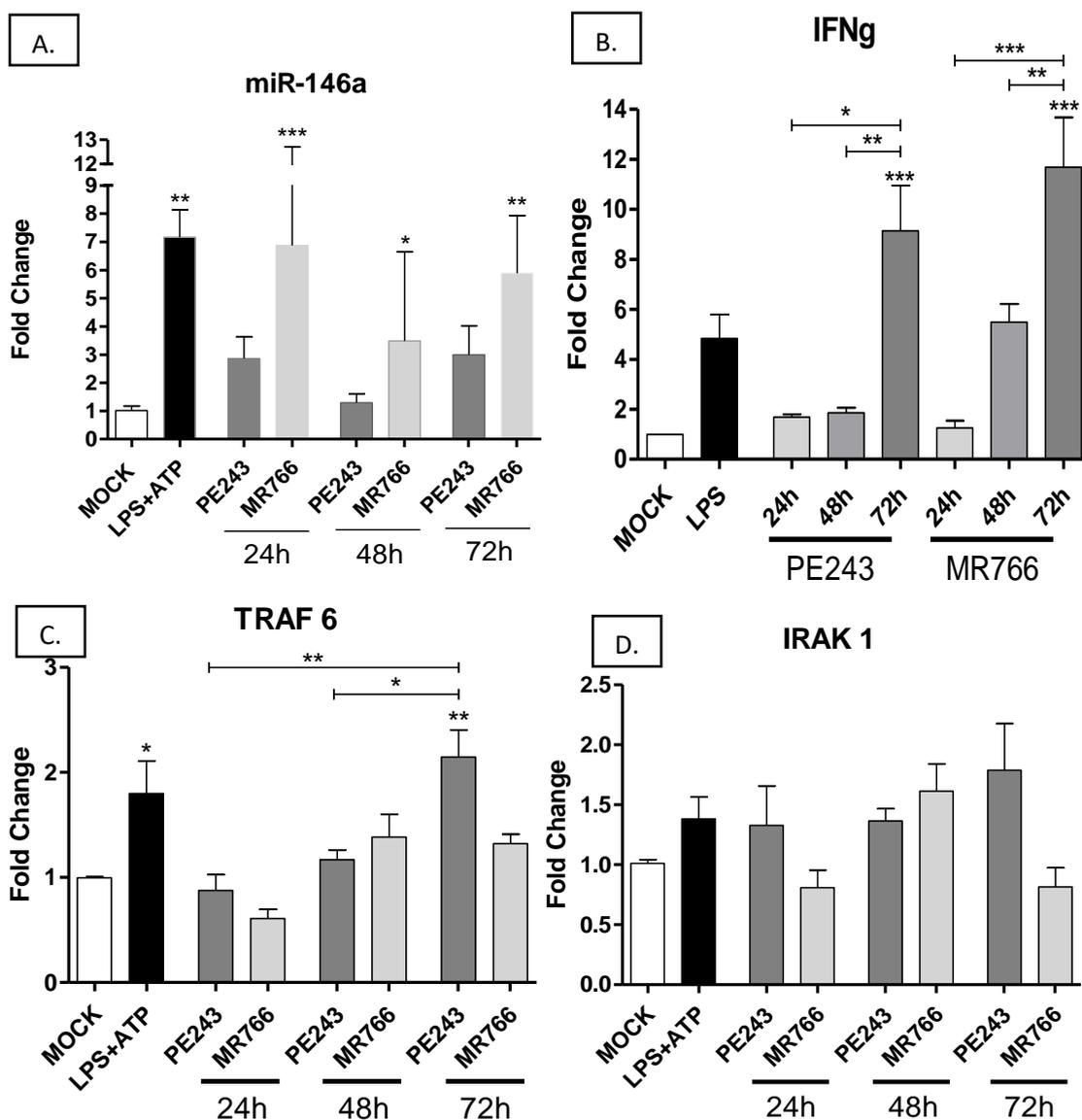
Ainda não há estudos relacionando miR-125b com ZIKV ou com microglia, porém há estudos associando este miRNA com o aumento da replicação viral em pacientes com Hepatite B por um mecanismo ainda desconhecido (LI et al., 2016). Além de ser um microRNA abundante no cérebro, o miR-125b é um importante regulador negativo da apoptose induzida por p53 durante a resposta ao estresse, se ligando na região 3'UTR do mRNA de p53, podendo aumentar assim a capacidade de replicação viral (LE et al., 2009). O perfil de expressão do miR-125b em BV2 infectadas com ZIKV obedece, mais uma vez, aos níveis de infectividade do vírus, com picos estatisticamente

significativos em 24 e 72h no caso do ZIKV<sub>MR766</sub> (Figura 21A), porém não foi observado alteração da replicação do vírus nesse mesmo período (Figura 16 C-D).

Não foi possível detectar mudanças expressivas na transcrição de TNF- $\alpha$  durante a infecção com ZIKV, porém, ainda que modesta, acompanhou o perfil inverso do seu miRNA repressor (Figura 21B).

Pesquisas recentes mostraram que o miR-125b pode regular negativamente também citocinas pró-inflamatórias se ligando na sequência complementar do 3'UTR do mRNA de TRAF6 (RASHEED et al., 2019). Os nossos ensaios confirmaram a correlação inversa entre a expressão de miR-125b e TRAF6 (Figura 22C).

Posteriormente foram analisados os níveis de expressão do miR-146a, assim como seus alvos - as proteínas TRAF6, IRAK1 e IFN- $\gamma$  (Figura 22).



**Figura 22. Alteração da expressão do miR-146a e seus alvos TRAF6, IRAK1 e IFN- $\gamma$  em células BV2 pela infecção do ZIKV.** Células BV2 foram infectadas por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i.. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS+ATP”. qPCR dos níveis de cópias de miRNAs e mRNA dos alvos. Os resultados plotados do  $\Delta\Delta C_t$  foram normalizados em relação ao HPRT1 e ao mock para os mRNAs, e em relação ao U6 e ao mock para os miRNAs. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  como diferença significativa, em relação ao mock quando não identificado pela barra.

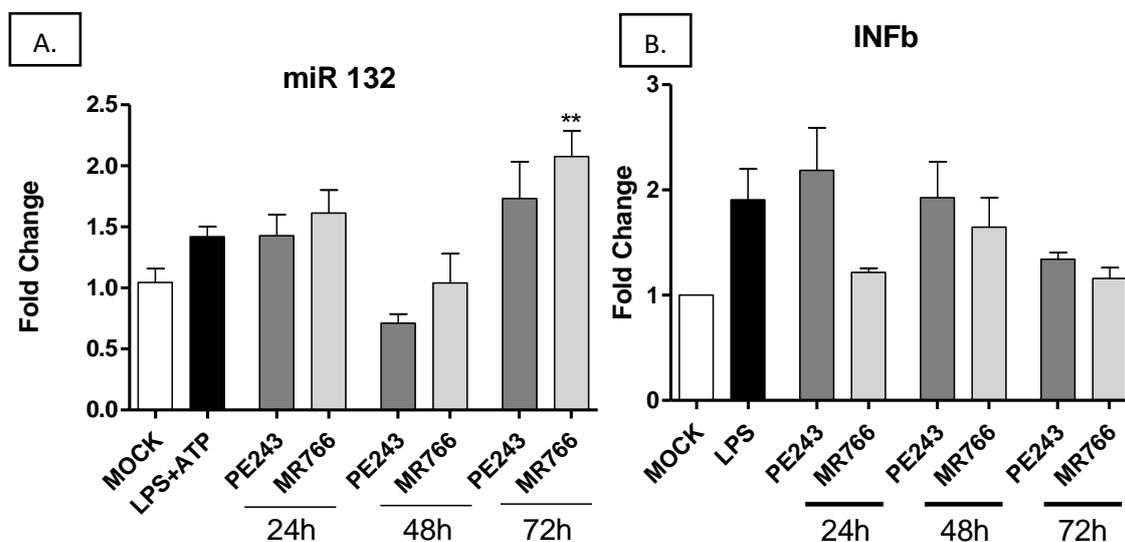
Foi possível observar um aumento significativo do nível de miR-146a após o tratamento com LPS+ATP, condizendo com estudos que apontam o aumento da expressão de miR-146a após estimulação com LPS ou IL-1 $\beta$  e não com TNF $\alpha$  ou outros ligante do mesmo TLR, sugerindo que a indução de miR-146a em resposta a estímulos inflamatórios é específica para o tipo celular e ligante (LV et al., 2017).

A indução da expressão de miR-146a mais tarde na resposta inflamatória tem uma importante função como regulador negativo das respostas imunes inatas, inibindo as vias de sinalização de TLR. O miR-146a suprime a produção de IFN tipo I inibindo IRAK1 e TRAF6 (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011). O perfil de expressão deste miRNA (Figura 22A) e seus dois alvos diretos (Figura 22C-D) coincidem inversamente, como esperado. É possível que o aumento desse miRNA, por controlar a expressão de TRAF6 e de IFN- $\beta$ , permita a maior replicação viral por ZIKV<sub>MR766</sub>. O ZIKV<sub>PE243</sub>, por sua vez, não induz expressivamente esse miRNA, o que inibiria em menor grau a ativação de TRAF6, induzindo a expressão de IFN- $\beta$  na infecção (Figura 23B), que pode ser um fator responsável, por um lado, por controlar a replicação e, por outro, levar à ativação celular.

TRAF6 é uma proteína adaptadora criticamente importante nas respostas antivirais envolvendo a via de sinalização do NF- $\kappa$ B. Pesquisas demonstraram que a NS5 de ZIKV<sub>MR766</sub> antagoniza a resposta imune inata do hospedeiro e promove a replicação do vírus interagindo com TBK1 e, assim, inibindo TRAF6 (LIN et al., 2019). Estes dados sustentam nossos resultados quanto aos menores níveis de expressão de TRAF6 observados na infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub> (Figura 22C).

Além disso, a NS5 do ZIKV mostrou suprimir as respostas do IFN tipo I e III, e também foi capaz de ativar a sinalização IFN tipo II. Os IFNs tipo II (IFN- $\gamma$ ) são gerados principalmente por células imunes e possuem algumas funções antivirais. A infecção por ZIKV, no entanto, é aumentada pela sinalização de IFN tipo II, que gera citocinas pró-inflamatórias que podem facilitar a disseminação viral e exacerbar a doença (THURMOND et al., 2018). A supressão das vias de IFN dos tipos I e III, assim como a

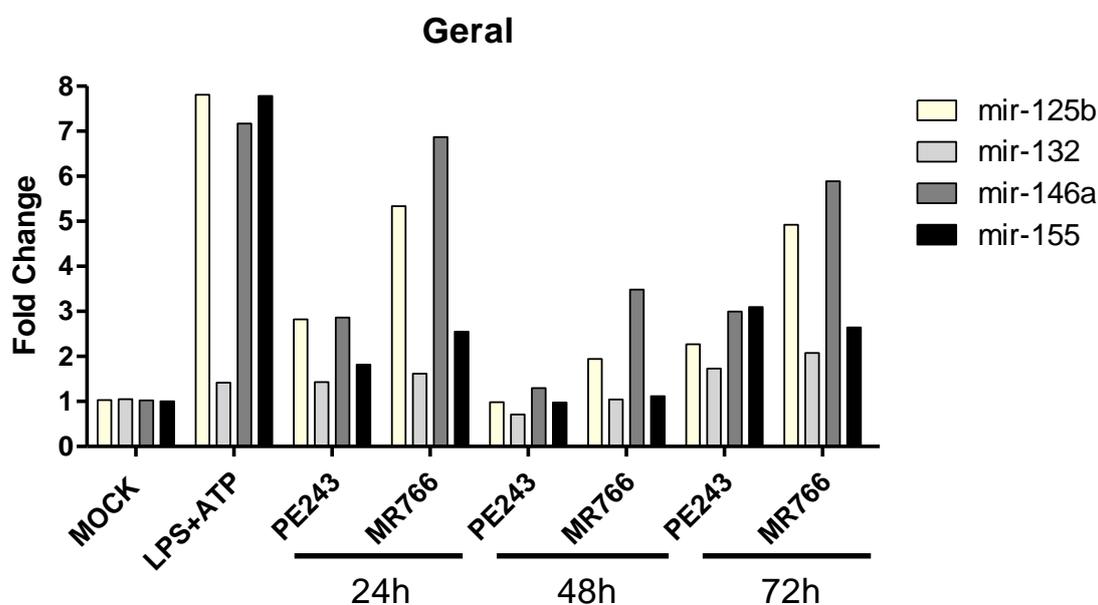
ativação da via do IFN tipo II mediada por NS5 foi sugerida ser por meio do aumento da homodimerização de STAT1, que aumenta a expressão gênica em sítios ativados por  $\gamma$  (GAS). Como o ZIKV NS5 induz a degradação de STAT2, que é necessária para a formação de complexos de transcrição envolvidos na sinalização de IFN tipo I e III, o balanço intracelular de complexos contendo STAT muda para os dímeros STAT1-STAT1, resultando em aumento de IFN- $\gamma$  expressão gênica induzida. Até o momento, o ZIKV NS5 é a única proteína viral conhecida por suprimir concomitantemente as vias dos IFN tipo I e III enquanto ativa o tipo II (HERTZOG et al., 2018). O IFN- $\gamma$  é conhecido por induzir a expressão de alguns fatores celulares que facilitam a replicação do ZIKV. Em particular, os fatores de entrada AXL, Tyro3 e DC-SIGN são codificados por genes estimulados por IFN- $\gamma$ . Além disso, a inflamação e a morte celular induzidas pelo IFN- $\gamma$  também podem facilitar a disseminação do ZIKV *in vivo* (CHAUDHARY et al., 2017). Isso corrobora com os dados de IFN- $\gamma$  estarem aumentados em 72h p.i. (Figura 22B) e coincidir com o pico de infectividade do vírus neste mesmo tempo (Figura E-F).



**Figura 23. Alteração da expressão do miR-132 em células BV2 pela infecção do ZIKV.** Células BV2 foram infectadas por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i.. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS+ATP”. qPCR dos níveis de cópias de miRNAs e mRNA dos alvos. Os resultados plotados do  $\Delta\Delta C_t$  foram normalizados em relação ao HPRT1 e ao mock para os mRNAs, e em relação ao U6 e ao mock para os miRNAs. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando  $**p < 0,01$  como diferença significativa em relação ao mock.

Finalmente, foram avaliados os níveis de expressão do miR-132 em células BV2 infectadas pelo ZIKV (Figura 23). O padrão de expressão deste miRNA foi similar ao observado nos miRNAs anteriormente analisados, com maiores níveis de expressão às 24

e 72hs pós infecção com os isolados. Uma vez mais os níveis deste miRNA foram maiores em células BV2 infectadas com o ZIKV<sub>MR766</sub> em todos os tempos. Por outro lado, os níveis de expressão deste miRNA mostraram uma correlação negativa com os de IFN- $\beta$  expressos pelas células infectadas, o que explicaria os maiores níveis de infectividade do ZIKV<sub>MR766</sub> em relação ao ZIKV<sub>PE24</sub> descrito em vários tipos celulares incluso o utilizado neste estudo (ESSER-NOBIS et al., 2019). Resultados obtidos por Lagos e colaboradores, demonstram que o miR-132 suprime o fator de transcrição CBP/p300 após ativação da transcrição após ligação viral regulando a resposta do IFN- $\beta$  (LAGOS et al., 2010). Este mecanismo foi envolvido na evasão da imunidade inata nos estágios iniciais de infecção primária (LIN et al., 2001). Por outro lado, a desregulação do equilíbrio miR-132-p300 afetaria outros processos biológicos envolvidos na diferenciação celular, com os relatados pela infecção pelo ZIKV.



**Figura 24.** Alteração da expressão dos miR-155, miR-146a, miR-132, miR-125b agrupados por tempo de infecção pelas cepas do ZIKV em células BV2. Células BV2 foram infectadas por ZIKV<sub>PE243</sub> ou ZIKV<sub>MR766</sub> com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i. por qPCR. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS+ATP”. Os resultados plotados do  $\Delta\Delta Ct$  foram normalizados em relação ao U6 e ao mock. Todos os experimentos foram feitos por triplicatas independentes.

A análise do padrão global de expressão dos diferentes miRNAs durante a infecção das células BV2 pelo ZIKV<sub>MR766</sub> e ZIKV<sub>PE243</sub> (Figura 24) nos permite realizar as seguintes observações:

- I. Os níveis de expressão global dos miRNAs analisados mostram maiores níveis 24 e 72h p.i. por isolados de ambas as cepas;

- II. O ZIKV<sub>MR766</sub> induz maiores níveis de expressão dos miR-125b, 155 e 146a que o ZIKV<sub>PE243</sub> nas primeiras 24h p.i.;
- III. A maior expressão do miR-155, nas primeiras 24h p.i. pelo ZIKV<sub>MR766</sub>, sugere a indução de uma resposta inflamatória maior que a infecção pelo ZIKV<sub>PE243</sub>;
- IV. O miR-146a mostrou o maior aumento entre os miRNAs analisados, após infecção por isolados de ambas as cepas, sendo maior na infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub>;
- V. O miR-125b mostrou o segundo maior aumento após infecção por isolados de ambas as cepas, e, igual ao observado no miR-146a, o ZIKV<sub>MR766</sub> estimulou maiores níveis de expressão que o ZIKV<sub>PE243</sub>;
- VI. É possível observar um leve aumento na expressão do miR-132 24, 48 e 72h após infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub> em relação ao ZIKV<sub>PE243</sub>;
- VII. O padrão de expressão dos miRNAs nas primeiras 24h, seria compatível com o final da fase inicial e/ou começo da resposta imune tardia;
- VIII. A ocorrência vários ciclos de infecção viral nas primeiras 24h pode ser um fator importante na pouca correlação entre os padrões de expressão dos miRNAs e a fase inicial da resposta inata;

## 6. Conclusões

- Os isolados ZIKV<sub>MR766</sub> e ZIKV<sub>PE243</sub> não induzem efeitos citopatogênicos em células da micróglia BV2;
- As células BV2 são permissivas à infecção por ZIKV e capazes de produzir vírus infeccioso;
- Os níveis de infectividade e replicação viral, de ambos os isolados em células BV2, foram menores que os descritos para outros tipos celulares;
- Os isolados ZIKV<sub>MR766</sub> e ZIKV<sub>PE243</sub> induzem a expressão dos marcadores de ativação Iba1, CD68 em células BV2, enquanto a expressão do MHC-II é aparentemente induzida apenas pelo ZIKV<sub>MR766</sub>;
- A infecção de células BV2 pelos isolados africano e asiático do ZIKV mostrou induzir a expressão dos miRNAs 155, 146a, 132 e 125b, envolvidos na regulação da resposta imune inata;
- O miR-155 mostrou uma maior expressão, apesar de não acentuada, 24h após infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub>, o que sugere a indução de uma resposta inflamatória

maior que a infecção pelo ZIKV<sub>PE243</sub>, embora esses resultados representem o período tardio da fase inicial da resposta inata;

- A diminuição da expressão do miR-155 em 48h e os níveis não tão aumentados 24h p.i. por ambas os isolados é condizente com a fase tardia da resposta inflamatória;
- A expressão dos alvos celulares do miR-155 - SOCS, SHIP1 e IL-10 - acompanharam as oscilações do miRNA e confirmam o padrão de expressão compatível com as fases inicial-tardia, tardia e crônica, correspondentes a 24, 48 e 72h p.i., respectivamente;
- O miR-146a mostrou o maior aumento em todos os miRNAs analisados, após infecção por ambas os isolados, sendo maior na infecção pelo ZIKV<sub>MR766</sub>;
- O aumento do miR-146a se correlacionou, de uma forma geral, com a diminuição de seus alvos TRAF6 e IRAK1, coincidindo com um padrão de resposta posterior à fase inicial;
- Os níveis de IFN- $\gamma$  observados 72h p.i. coincidem com um padrão tardio da resposta inata, sugerindo a possível contribuição desta citocina com a replicação viral nestas fases para ambas as cepas;
- Os níveis do miR-125b mostraram o segundo maior aumento após infecção por ambas os isolados e, igual ao observado no miR-146a, o ZIKV<sub>MR766</sub> estimulou maiores níveis de expressão que o ZIKV<sub>PE243</sub> e também confirmaram a coincidência dos tempos analisados com as fases tardias da resposta imune inata;
- A observação inesperada de altos níveis de expressão dos miR-125b e 146a nas primeiras 24h se correlacionariam com o padrão de expressão correspondente ao final de uma resposta inflamatória aguda;
- O miR-132 mostrou uma maior expressão 24, 48 e 72h p.i. pelo ZIKV<sub>MR766</sub>, o que suportaria a maior diminuição observada da expressão de IFN- $\beta$  pelas BV2, em relação ao isolado brasileiro, embora essas diferenças sejam discretas;
- A diminuição observada tanto na replicação viral como na expressão dos miRNAs 48h p.i. pelos isolados das duas cepas, é um fator intrigante que pode estar relacionado à dinâmica da resposta imune, coincidindo com uma fase tardia e consequente diminuição das citocinas inflamatórias, fenômeno que se reverte posteriormente pela produção de citocinas pró-virais, como IFN- $\gamma$  e IL-10.

## 7. Perspectivas

Em base a análises dos resultados obtidos nesta primeira fase de nosso estudo, nós propomos os seguintes passos:

- Avaliar a expressão dos miRNAs 155, 125b, 146a e 132, assim como seus alvos celulares nos tempos de 6 e 12h p.i. com objetivo de identificar o padrão de expressão na fase inicial aguda da resposta inata;
- Avaliar a expressão dos alvos celulares por *immunoblotting* e ELISA com objetivo de confirmar a expressão das diferentes proteínas;
- Avaliar a expressão dos fatores celulares IRF3, IRF7 envolvidos na transdução de sinal das vias de ativação dos TLR;

## 8. Referências Bibliográficas

- ADAMS WALDORF, K. M. et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. **Nature Medicine**, 2018.
- AGRATI, C. et al. Activated V gamma 9V delta 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release. **J Immunol**, 2009.
- AGRATI, C. et al. Longitudinal characterization of dysfunctional T cell-activation during human acute Ebola infection. **Cell Death and Disease**, 2016.
- ALEXOPOULOU, L.; DESNUES, B.; DEMARIA, O. [Toll-like receptor 8: the awkward TLR]. **Médecine sciences : M/S**, 2012.
- ALIOTA, M. T. et al. Heterologous Protection against Asian Zika Virus Challenge in Rhesus Macaques. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.
- ALLONSO, D. et al. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. **Journal of Virology**, 2015.
- ALVAREZ-GARCIA, I. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development**, 2005.
- ALVAREZ, J. I.; KATAYAMA, T.; PRAT, A. Glial influence on the blood brain barrier. **GLIA**, 2013.
- ARGAW, A. T. et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. **Journal of Clinical Investigation**, 2012.
- ASHRAF, U. et al. MicroRNA-19b-3p Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF11. **Journal of Virology**, v. 90, n. 9, p. 4780–4795, 2016.
- ASIF, A. et al. Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. **Viral immunology**, 2017.
- BAETZ, A. et al. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptor Signaling in Innate Immune Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54708–54715, 2004.
- BARBALAT, R. et al. Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. **Annual Review of Immunology**, 2011.
- BARONTI, C. et al. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia Outbreak in 2013. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 2013–2014,

2014.

BARTEL, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BARTON, G. M.; KAGAN, J. C. A cell biological view of toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. **Nature Reviews Immunology**, 2009.

BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 2016.

BEARCROFT, W. G. C. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1956.

BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. MicroRNAs: Novel regulators during the immune response. **Journal of Cellular Physiology**, 2009.

BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 3–18, 2013.

BOIGARD, H. et al. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2017.

BOLLINGER, C. R.; TEICHGRÄBER, V.; GULBINS, E. Ceramide-enriched membrane domains. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2005.

BOORMAN, J. P. T.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of Zika virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 238–242, 1956.

BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells.

**PLoS Pathogens**, 2017.

BRINTON, M. A.; BASU, M. Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. **Virus Research**, v. 206, p. 108–119, 2015.

BRITO, C. Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. **Acta Médica Portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 679, 2016.

BROWN, G. C.; VILALTA, A. How microglia kill neurons. **Brain Research**, 2015.

BRUGNARO, P. et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 10, p. 1–5, 2016.

CABALLERO-GARRIDO, E. et al. In Vivo Inhibition of miR-155 Promotes Recovery after Experimental Mouse Stroke. **Journal of Neuroscience**, 2015.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, 2018.

CALDEIRA, C. et al. Microglia change from a reactive to an age-like phenotype with the time in culture. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2014.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**. 4th. ed. University of Leicester, UK: Elsevier Academic Press, 2005.

CAO-LORMEAU, V. M. RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, 2014.

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

- CARDOSO, A. L. et al. miR-155 modulates microglia-mediated immune response by down-regulating SOCS-1 and promoting cytokine and nitric oxide production. **Immunology**, v. 135, n. 1, p. 73–88, 2012.
- CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal of Medicine**, 2016.
- CASTILLO RAMIREZ, J. A.; URCUQUI-INCHIMA, S. Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 6, p. 421–430, 2015.
- CDC. Arbovirus Catalog - Zika. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 24, n. 7, p. 1–8, 1985.
- CEPPI, M. et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009.
- CHAN, J. F. W. et al. Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. **Antiviral Research**, v. 141, p. 29–37, 2017.
- CHANG, C. Y. et al. Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. **GLIA**, 2015.
- CHAUDHARY, V. et al. Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. **Journal of Virology**, v. 91, n. 14, p. 1–17, 2017.
- CHEN, T. Research advancements in the neurological presentation of flaviviruses. **Rev Med Virol.**, v. e, n. 2021, p. 1–12, 2018.
- CHEN, Y. et al. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection. **Medical Microbiology and Immunology**, 2012.
- CHENDRIMADA, T. P. et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. **Nature**, v. 447, n. June, 2007.
- CHERAY, M.; JOSEPH, B. Epigenetics Control Microglia Plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2018.
- CHIMELLI, L. et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. **Acta Neuropathologica**, 2017.
- CHOW, B. W.; GU, C. The Molecular Constituents of the Blood-Brain Barrier. **Trends in Neurosciences**, 2015.
- CIMINI, E. et al. Human Zika infection induces a reduction of IFN- $\gamma$  producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V $\delta$ 2 T-cells. **Scientific Reports**, 2017.
- COELHO, S. V. A. et al. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. **Journal of Virological Methods**, v. 246, p. 65–74, 2017.
- COFFEY, L. L. et al. Intraamniotic Zika virus inoculation of pregnant rhesus macaques produces fetal neurologic disease. **Nature Communications**, 2018.
- COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity** *Nature Immunology*, 2004.
- COLTON, C. A.; GILBERT, D. L. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. **FEBS Letters**, 1987.
- CONTRERAS, D.; ARUMUGASWAMI, V. Zika Virus Infectious Cell Culture System and the *In Vitro* Prophylactic Effect of Interferons. **Journal of Visualized Experiments**, n. 114, p. 10–13, 2016.
- CROCE, C. M.; CALIN, G. A. **miRNAs, cancer, and stem cell division** *Cell*, 2005.
- CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 2016.
- DA CONCEIÇÃO, T. M. et al. Essential role of RIG-I in the activation of

- endothelial cells by dengue virus. **Virology**, 2013.
- DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Article Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**, 2016.
- DEL CAMPO, M. et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, 2017.
- DIAGNE, C. T. et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 2–7, 2015.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–20, 1952.
- DIOP, F. et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. **PLoS ONE**, 2018.
- DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1–20, 2016.
- DOUAM, F. et al. Type III Interferon-Mediated Signaling Is Critical for Controlling Live Attenuated Yellow Fever Virus Infection In Vivo . **mBio**, 2017.
- DUAN, W. et al. The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 7, p. 919–933, 2017.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- DUMBREPATIL, A. B. et al. Viperin interacts with the kinase IRAK1 and the E3 ubiquitin ligase TRAF6, coupling innate immune signaling to antiviral ribonucleotide synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, 2019.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.
- EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4285–4290, 2014.
- EDWARDS, A. D. et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: Lack of TLR7 expression of CD8 $\alpha$  + DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. **European Journal of Immunology**, 2003.
- ELONG NGONO, A. et al. Mapping and Role of the CD8+T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host and Microbe**, 2017.
- ELTON, T. S. et al. **Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes** *Gene*, 2013.
- ESSER-NOBIS, K. et al. Comparative Analysis of African and Asian Lineage-Derived Zika Virus Strains Reveals Differences in Activation of and Sensitivity to Antiviral Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 93, n. 13, 2019.
- EULALIO, A. et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. **Nature**, 2012.
- FABRY, Z. et al. TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1995.
- FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J. Hyg., Camb.**, v. 83, p. 213–219, 1979.
- FALASCA, L. et al. Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: Focus on cell death. **Cell Death and Differentiation**,

2015.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus, an neglected emerging disease in Africa and Asia. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 1, p. P59, 2011.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. **EcoHealth**, v. 15, n. 4, p. 864–870, 2018.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 102–114, 2008.

FONTAINE, K. A. et al. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. **Journal of Virology**, 2015.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRANÇA, G. V. A. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, 2016.

FRANCOLINI, M. et al. Role of Capsid Anchor in the Morphogenesis of Zika Virus. **Journal of Virology**, v. 92, n. 22, 2018.

FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells

leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. **Virology**, 2016.

G. W. A. DICK. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46., n. 5, p. 521–34, 1952.

GALLIEZ, R. M. et al. Zika virus causing encephalomyelitis associated with immunoactivation. **Open Forum Infectious Diseases**, 2016.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus: Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, 2016.

GENC, K.; TUFEKCI, K. U.; GENC, S. The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, 2011.

GHOSHAL, A. et al. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. **GLIA**, 2007.

GIULIAN, D. et al. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. **The Journal of Neuroscience**, 1989.

GLASNER, A. et al. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. **Journal of Virology**, 2017.

GONZÁLEZ-SCARANO, F.; BALTUCH, G. Microglia as Mediators of Inflammatory and Degenerative Diseases. **Annual Review of Neuroscience**, 2002.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, 2010.

GOTTWEIN, E. et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. **Nature**, v. 450, p. 1096–1099, 2007.

GOULD, E.; SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses** **The Lancet**, 2008.

GOURINAT, A. et al. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious**

- Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.
- GRAEBER, M. B.; SCHEITHAUER, B. W.; KREUTZBERG, G. W. Microglia in brain tumors. **GLIA**, 2002.
- GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. Microglia: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, 2010.
- GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.
- GRANWEHR, B. P. et al. Reviews West Nile virus : where are we now ? **The Lancet**, v. 4, n. September, p. 547–556, 2004.
- GRIMSON, A. et al. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. **Cell**, v. 27, p. 91–105, 2007.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, 2015.
- HAMMOND, S. M. MicroRNAs as oncogenes. **Current Opinion in Genetics and Development**, 2006.
- HANNERS, N. W. et al. Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2315–2322, 2016.
- HARAK, C.; LOHMANN, V. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. **Virology**, v. 479–480, p. 418–433, 2015.
- HASSERT, M. et al. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. **PLoS Pathogens**, 2018.
- HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2009.
- HEINEMANN, U.; KAUFER, D.; FRIEDMAN, A. Blood-brain barrier dysfunction, TGF $\beta$  signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. **GLIA**, 2012.
- HEMERT, F. VAN; BERKHOUT, B. Nucleotide composition of the Zika virus RNA genome and its codon usage. **Virology Journal**, p. 1–9, 2016.
- HENDRICKX, D. A. E. et al. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. **Journal of Neuroimmunology**, v. 309, p. 12–22, 2017.
- HERTZOG, J. et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 7, p. 1120–1136, 2018.
- HISHIKAWA, D. et al. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008.
- HOLNESS, C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood**, 1993.
- HONDA, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, 2005.
- HORVATH, R. J. et al. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. **Journal of Neurochemistry**, 2008.
- HOU, J. et al. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. **The Journal of Immunology**, 2009.
- HOWARD, C. R. Aedes mosquitoes and

- Zika virus infection: an A to Z of emergence? **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. 2, p. e16, 2016.
- HUBER, T. et al. Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2013.
- HUSSMANN, K. L. et al. Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes. **Journal of Virology**, 2012.
- IMAI, Y. et al. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1996.
- ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. **Molecular Brain Research**, 1998.
- ITO, D. et al. Enhanced Expression of *Iba1*, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1208–1215, 2011.
- IYER, A. et al. MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. **PLoS ONE**, 2012.
- JAHANBAN-ESFAHLAN, R. et al. Toll-like receptors as novel therapeutic targets for herpes simplex virus infection. **Reviews in Medical Virology**, n. December 2018, p. 1–14, 2019.
- JAYADEV, S. et al. Transcription factor p53 influences microglial activation phenotype. **GLIA**, 2011.
- JENNEWEIN, C. et al. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) mRNA destabilization. **Journal of Biological Chemistry**, 2010.
- JOGI, M. et al. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 32, p. 48–53, 2015.
- JOST, S.; ALTFELD, M. Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. **Annual Review of Immunology**, 2013.
- JULIANO, S. A.; LOUNIBOS, L. P. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. **Ecol Lett.**, v. 8, n. 5, p. 558–574, 2005.
- JURADO, K. A. et al. Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. **Nature Microbiology**, 2018.
- KALKERI, R.; MURTHY, K. K. Zika virus reservoirs: Implications for transmission, future outbreaks, drug and vaccine development. **F1000Research**, 2017.
- KANG, C. B.; KELLER, T. H.; LUO, D. Zika Virus Protease: An Antiviral Drug Target. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 797–808, 2017.
- KAUL, D. et al. Expression of toll-like receptors in the developing brain. **PLoS ONE**, 2012.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, 2010.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, 2011.
- KESSON, A. M.; KING, N. J. C. Transcriptional Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Flavivirus West Nile Is Dependent on NF- $\kappa$ B Activation. **The Journal of Infectious Diseases**, 2002.
- KHROMYKH, A. A. et al. Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13486–13500, 2012.
- KING, N. J. C.; KESSON, A. M. Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expression follow flavivirus infection. **Journal of General Virology**, 1988.
- KOHLHAAS, S. et al. Cutting Edge: The

- Foxp3 Target miR-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, 2009.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic Structure of Dengue Serotype 4 Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 1, p. 477–482, 2013.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425–428, 19 maio 2016.
- KUHN, R. J. **Understanding Zika Virus Structure and Replication**. 2015
- KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, 2016.
- LAGOS, D. et al. MiR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 513–519, 2010.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- LANNES, N.; SUMMERFIELD, A.; FILGUEIRA, L. Regulation of inflammation in Japanese encephalitis. **Journal of Neuroinflammation**, 2017.
- LAZEAR, H. M. et al. Interferon- $\lambda$  restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. **Science Translational Medicine**, 2015.
- LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.
- LE, M. T. N. et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. **Genes and Development**, v. 23, n. 7, p. 862–876, 2009.
- LEBRUN, G. et al. Guillain-barré syndrome after chikungunya infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 495–496, 2009.
- LEDERMANN, J. P. et al. Aedes hensilli as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.
- LEE, M. N. et al. Common Genetic Variants Modulate Pathogen-Sensing Responses in Human Dendritic Cells. **Science**, v. 343, 2014.
- LEI, J. et al. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 503–505, Jul 2016.
- LEI, J. et al. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 503–505, 2016.
- LEIS, A. A.; STOKIC, D. S. Neuromuscular Manifestations of West Nile Virus Infection. **Frontiers in Neurology**, v. 3, n. 37, 2012.
- LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, 2016a.
- LI, F. et al. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, 2015.
- LI, F. et al. Serum microRNA-125b correlates with hepatitis B viral replication and liver necroinflammation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 4, p. 384.e1–384.e10, 2016b.
- LI, F. et al. AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 3, p. 3–4, 2017.
- LI, Y. Y. et al. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. **Neuroscience Letters**, 2011.
- LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p.

663–671, 2016.

LIN, R. et al. HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. **Oncogene**, v. 20, n. 7, p. 800–811, 2001.

LIN, S. et al. Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. **Virology**, v. 527, p. 180–187, 2019.

LIU, Y. et al. Flavivirus infection up-regulates the expression of class I and class II major histocompatibility antigens on and enhances T cell recognition of astrocytes in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, 1989.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LUCAS, C. G. O. et al. Critical role of CD4+ T cells and IFN $\gamma$  signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. **Nature Communications**, 2018.

LUM, F. M. et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, 2017.

LV, H. et al. TRAF6 is a novel NS3-interacting protein that inhibits classical swine fever virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

MACNAMARA, F. N. Zika Virus: a Report on Three Cases of Human Infection During an Epidemic of Jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, 1954.

MAGNANI, D. M. et al. Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. **Nature Communications**, 2018.

MANN, D. L. The Emerging Role of Innate Immunity in the Heart and For Whom the Cell Tolls. v. 108, p. 1122–1132, 2011.

MANSUY, J. M. et al. Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; VÁZQUEZ-CALVO, Á.; SAIZ, J. C. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. **Progress in Lipid Research**, 2016.

MARTINEZ, N. J.; WALHOUT, A. J. M. The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. **BioEssays**, 2009.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, 2008.

MATHONNET, G. et al. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. **Science**, v. 317, p. 1764–1767, 2007.

MATSUMOTO, H. et al. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. **Journal of Neuroscience Research**, 2007.

MATSUMOTO, M.; OSHIUMI, H.; SEYA, T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. **Reviews in Medical Virology**, 2011.

MAVIGNER, M. et al. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. **Science Translational Medicine**, 2018.

MCCRAE, A. W. R.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 552–562, 1982.

- MCELROY, A. K. et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015.
- MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, 1995.
- MCGRATH, E. L. et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. **Stem Cell Reports**, 2017.
- MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, 2017.
- MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.
- MENDELL, J. T. MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. **Cell Cycle**, 2005.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39–44, 2006.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, 2017.
- MINKIEWICZ, J.; DE RIVERO VACCARI, J. P.; KEANE, R. W. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. **GLIA**, 2013.
- MISRA, U. K. et al. Neurological manifestations of dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**, 2006.
- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The new engl and journal of medicine Brief**, p. 951–958, 2016.
- MOORE, S.; THANOS, S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. **Progress in Neurobiology**, 1996.
- MOR, G. Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development. **American Journal of Reproductive Immunology**, 2016.
- MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Chikungunya at the Door — Déjà Vu All Over Again? **New England Journal of Medicine**, 2014.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, 2008.
- MUSSO, D. et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.
- MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887, 2015.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.
- MUSTAFÁ, Y. M. et al. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 525, 2019.
- NAGYOSZI, P. et al. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. **Neurochemistry International**, 2010.
- NAZERAI, L. et al. A new in vivo model to study protective immunity to Zika virus infection in mice with intact type I interferon signaling. **Frontiers in Immunology**, 2018.
- NAZERAI, L.; CHRISTENSEN, J. P.; THOMSEN, A. R. A ‘ Furry-Tale ’ of Zika Virus Infection : What Have We Learned from Animal Models ? n. February 2016, p. 1–13, 2019.

- NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, 2018.
- NISHIYAMA, K. et al. Fatty acid transport protein 1 enhances the macrophage inflammatory response by coupling with ceramide and c-Jun N-terminal kinase signaling. **International Immunopharmacology**, 2018.
- NOTTROT, S.; SIMARD, M. J.; RICHTER, J. D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. **Nature**, v. 13, n. 12, p. 1108–1114, 2006.
- NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell stem cell**, 2016.
- O'NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 163–175, 2011.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 9, p. 1–3, 2014.
- OHSAWA, K. et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **Journal of cell science**, 2000.
- OUSMAN, S. S.; KUBES, P. Immune surveillance in the central nervous system. **Nature Neuroscience**, 2012.
- PAPA, M. P. et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2557, 2017a.
- PAPA, M. P. et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 2017b.
- PARDY, R. D. et al. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. **PLoS Pathogens**, 2017.
- PAUL, S.; SHILPI; LAL, G. Role of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in autoimmunity. **Journal of Leukocyte Biology**, 2014.
- PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69–88, 2014.
- PETERSEN, C. P. et al. Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. **Cell**, v. 21, p. 533–542, 2006.
- PETERSEN, E. et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 11–15, 2016.
- PETITDEMANGE, C. et al. Control of acute dengue virus infection by natural killer cells. **Frontiers in Immunology**, 2014.
- PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2015.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001.
- PFEFFER, S. et al. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. **Science**, v. 304, p. 734–736, 2004.
- PIJLMAN, G. P. et al. A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. **Cell Host and Microbe**, v. 4, n. 6, p. 579–591, 2008.
- PINGEN, M. et al. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, 2016.
- PINGEN, M. et al. Mosquito Biting Modulates Skin Response to Virus Infection. **Trends in Parasitology**, 2017.

- POCCIA, F. et al. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. **Microbes Infect**, 2005.
- POCCIA, F. et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses: the role played by V gamma 9V delta 2 T cells. **The Journal of infectious diseases**, 2006.
- POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, 2004.
- PONOMAREV, E. D. et al. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- $\alpha$ -PU.1 pathway. **Nature Medicine**, 2011.
- POTH, J. M. et al. Monocyte-Mediated Inhibition of TLR9-Dependent IFN- Induction in Plasmacytoid Dendritic Cells Questions Bacterial DNA as the Active Ingredient of Bacterial Lysates. **The Journal of Immunology**, 2010.
- RASHEED, Z. et al. MicroRNA-125b-5p regulates IL-1 $\beta$  induced inflammatory genes via targeting TRAF6-mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling in human osteoarthritic chondrocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- RAVI, V. et al. Association of Japanese encephalitis virus infection with Guillain-Barré syndrome in endemic areas of South India. **Acta Neurologica Scandinavica**, 1994.
- ROCHFORD, K. D. et al. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: Consequences for interendothelial adherens and tight junctions. **PLoS ONE**, 2014.
- ROE, K. et al. West nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. **Journal of General Virology**, 2012.
- ROTHAN, H. A. et al. **Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells** **Molecular Neurobiology**, 2019.
- SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, 2011.
- SAIKA, R. et al. MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, 2017.
- SAPPARAPU, G. et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, 2016.
- SAXENA, S. K. et al. Zika virus outbreak : an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virus Disease**, v. 27, n. 2, p. 111–115, 2016.
- SCHOGGINS, J. W.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. **Current Opinion in Virology**, 2011.
- SCHREIBELT, G. et al. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. **The FASEB Journal**, 2007.
- SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2016.
- SCHWARTZ, M. et al. Microglial phenotype: Is the commitment reversible? **Trends in Neurosciences**, 2006.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.
- SESDF, S. DE V. À S. Comportamento epidemiológico das arboviroses no Distrito Federal, até a semana epidemiológica n° 08, 2019. **Informativo epidemiológico - GDF**, v. 14, n. 8, 2019.
- SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Reviews in Medical Virology**, v. e, n. 2050, p. 1–16, 2019.
- SHAO, Q. et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and

- results in postnatal microcephaly with brain damage. **Development**, 2016.
- SHEN, J. et al. Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. **Journal of Virology**, 1997.
- SHEN, K.; SIDIK, H.; TALBOT, W. S. The Rag-Ragulator Complex Regulates Lysosome Function and Phagocytic Flux in Microglia. **Cell Reports**, 2016.
- SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.
- SIMONIN, Y. et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, v. 12, p. 161–169, 2016.
- SIMONIN, Y. et al. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–8, 2017.
- SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.**, v. 58, n. 4, p. 335–338, 1964.
- SMITH, M. E.; VAN DER MAESEN, K.; SOMERA, F. P. Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: Phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. **Journal of Neuroscience Research**, 1998.
- SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neuroscience**, 2015.
- SOLOMON, T. Recent advances in Japanese encephalitis. **Journal of NeuroVirology**, 2003.
- SONG, L. et al. Cellular MicroRNAs Inhibit Replication of the H1N1 Influenza A Virus in Infected Cells. **Journal of Virology**, 2010.
- STOCK, C. et al. Lysophosphatidylcholine Stimulates IL-1 Release from Microglia via a P2X7 Receptor-Independent Mechanism. **The Journal of Immunology**, 2014.
- STREIT, W. J.; GRAEBER, M. B.; KREUTZBERG, G. W. Functional plasticity of microglia: A review. **Glia**, 1988.
- STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, 1999.
- SU, W. et al. The p53 Transcription Factor Modulates Microglia Behavior through MicroRNA-Dependent Regulation of c-Maf. **The Journal of Immunology**, 2014.
- SU, W.; ALOI, M. S.; GARDEN, G. A. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2016.
- TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host and Microbe**, 2016.
- TAGANOV, K. D. et al. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2006.
- TANAKA, Y. et al. Increased lysosomal biogenesis in activated microglia and exacerbated neuronal damage after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. **Neuroscience**, 2013.
- TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, 2016.
- TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, 2016.
- TENOEVER, B. R. The Evolution of Antiviral Defense Systems. **Cell Host and Microbe**, 2016.
- THOME, A. D. et al. microRNA-155 Regulates Alpha-Synuclein-Induced Inflammatory Responses in Models of Parkinson Disease. **The Journal of**

**Neuroscience**, 2016.

THOMPSON, M. R. et al. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 920–940, 23 jun. 2011.

THOUNAOJAM, M. C. et al. MicroRNA 155 Regulates Japanese Encephalitis Virus-Induced Inflammatory Response by Targeting Src Homology 2-Containing Inositol Phosphatase 1. **Journal of Virology**, v. 88, n. 9, p. 4798–4810, 2014.

THURMOND, S. et al. Suppression of type I interferon signaling by flavivirus NS5. **Viruses**, v. 10, n. 12, p. 1–16, 2018.

TILI, E. et al. Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5082–5089, 2007.

TIWARI, S. K. et al. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. **Emerging Microbes and Infections**, 2017.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

TORRENTES-CARVALHO, A. et al. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. **Immunobiology**, 2014.

TRICARICO, P. M. et al. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017.

TRIPATHI, S. et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 3, p. 1–19, 2017.

TU, W. et al. The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza

pathogenesis by expanding a  $\gamma\delta$  T cell population in humanized mice. **The Journal of Experimental Medicine**, 2011.

VAN DEN BERG, B. et al. Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **Nature Reviews Neurology**, 2014.

VAN RHIJN, I. et al.  $\gamma\delta$  T cell non-responsiveness in Campylobacter jejuni-associated Guillain-Barré syndrome patients. **Neurology**, 2003.

VAN VLIET, E. A. et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation. **Epilepsia**, 2012.

VANTOUROUT, P.; HAYDAY, A. Six-of-the-best: Unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. **Nature Reviews Immunology**, 2013.

VATTI, A. et al. Original antigenic sin: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 12–21, 2017.

VELANDIA-ROMERO, M. L.; ACOSTA-LOSADA, O.; CASTELLANOS, J. E. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. **Journal of NeuroVirology**, 2012.

VERMA, S. et al. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. **Virology**, 2009.

VERMA, S. et al. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. **Virology**, 2010.

VIEIRA, C. J. DA S. P. et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 1–5, 2015.

VINCENT, I. E. et al. Hepatitis B virus impairs tlr9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. **PLoS ONE**, 2011.

- VIRALZONE, S. I. B. **Zika virus**. Disponível em: <[https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_species#tab2](https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species#tab2)>. Acesso em: 13 fev. 2019.
- WANG, K. et al. IP-10 promotes blood-brain barrier damage by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. **Frontiers in Immunology**, 2018.
- WANG, P. et al. Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. **Journal of Virology**, 2008a.
- WANG, S. et al. Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 2008b.
- WANG, T. et al. Gamma delta T cells facilitate adaptive immunity against West Nile virus infection in mice. **J Immunol**, 2006.
- WANG, T. Role of  $\gamma\delta$  T cells in West Nile virus-induced encephalitis: Friend or foe? **Journal of Neuroimmunology**, v. 22, n. 7, p. 240–241, 2011.
- WEINBREN, M. P.; WILLIAMS, M. C. Zika Virus: Further Isolations in the Zika Area, and Some Studies on the Strains Isolated. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 52, n. 3, p. 263–268, 1958.
- WHO. Zika virus, microcephaly and Guillain-Barré syndrome situation report. **World Health Organization**, p. 1–6, 2017.
- WIKAN, N.; SMITH, D. R. **Zika virus: History of a newly emerging arbovirus** **The Lancet Infectious Diseases**, 2016.
- WINER, J. et al.  $\gamma\delta$  T cells infiltrating sensory nerve biopsies from patients with inflammatory neuropathy. **Journal of Neurology**, 2002.
- WINKLER, C. W. et al. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. **The Journal of Immunology**, 2017.
- WONG, A. M. et al. Macrosialin increases during normal brain aging are attenuated by caloric restriction. **Neuroscience Letters**, v. 390, n. 2, p. 76–80, 2005.
- WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. **PNAS**, v. 103, n. 11, p. 4034–4039, 2006.
- WU, X. Y. et al. Regulation of microRNA-155 in Endothelial Inflammation by Targeting Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B P65. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2014.
- WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the cooperation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, 2017.
- XIE, X.; SHAN, C.; SHI, P. Y. Restriction of Zika Virus by Host Innate Immunity. **Cell Host and Microbe**, 2016.
- XU, X. et al. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 20, p. 2170–2178, 2016.
- XUE, M. et al. A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- YANG, Y. et al. MiR-124 Enriched Exosomes Promoted the M2 Polarization of Microglia and Enhanced Hippocampus Neurogenesis After Traumatic Brain Injury by Inhibiting TLR4 Pathway. **Neurochemical Research**, 2019.
- YE, J. et al. **Immune evasion strategies of flaviviruses** **Vaccine**, 2013.
- YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–1057, 2000.
- YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 7120, n. 358, p. 933–936, 2017.

ZAMANIAN, J. L. et al. Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. **Journal of Neuroscience**, 2012.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHANG, J. et al. Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2016.

ZHAO, X. et al. Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. **Cell Reports**, v. 22, n. 8, p. 2080–2093, 2018.

ZHU, Z. et al. Comprehensive characterization of serum microRNA profile in response to the emerging avian influenza A (H7N9) virus infection in humans. **Viruses**, 2014.