

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUSTAVO ANDRADE BRANCAGLION

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA APÓS INFECÇÃO PELO *Zika virus*
EM MACRÓFAGOS PREVIAMENTE INFECTADOS COM *Dengue virus***

Alfenas/MG

2019

GUSTAVO ANDRADE BRANCAGLION

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA APÓS INFECÇÃO PELO *Zika virus*
EM MACRÓFAGOS PREVIAMENTE INFECTADOS COM *Dengue virus***

Defesa de Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Leonardo Augusto de Almeida.

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

B816a Brancaglioni, Gustavo Andrade.
Avaliação da resposta imune inata após infecção pelo *Zika virus* em macrófagos previamente infectados com *Dengue virus*. / Gustavo Andrade Brancaglioni - Alfenas/MG, 2019.
81 f.: il. --

Orientador: Leonardo Augusto de Almeida.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Dengue. 2. Zika virus. 3. Imunidade Inata. 4. Macrófagos. 5. MicroRNAs. I. Almeida, Leonardo Augusto de. II. Título.

CDD-571.96



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas, MG
CEP 37130-001



GUSTAVO ANDRADE BRANCAGLION

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA APÓS INFECÇÃO PELO *Zika virus* EM
MACRÓFAGOS PREVIAMENTE INFECTADOS COM *Dengue virus*”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 11 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Leonardo Almeida

Prof. Dr. Carlos Roberto Prudêncio

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura: Carlos Roberto Prudêncio

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Masaharu Ikegaki

RESUMO

O *Dengue virus* (DENV) é um vírus de RNA da família *Flaviviridae* compreendendo quatro sorotipos relacionados, mas antígenicamente distintos. A dengue é a principal doença viral transmitida por artrópodes no mundo e representa um importante problema de saúde humana global, especialmente no Brasil onde em 2016 também foi registrado o maior surto de infecção pelo *Zika virus* (ZIKV), outro flavivírus com características genômicas e estruturais semelhantes ao DENV. A co-circulação de DENV e ZIKV é realidade no Brasil fornecendo evidências, inclusive, da existência de uma co-infecção. A resposta imune inicial contra ZIKV e DENV em células é mediado pelos receptores da imunidade inata que ativam sinalizações para expressão de genes antivirais ou pró-inflamatórios. Dessa forma, o presente estudo tem por finalidade uma melhor compreensão da resposta imune inata frente à infecção pelo ZIKV em macrófagos previamente infectados pelo DENV. Para isso, células da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram diferenciadas em macrófagos (BMDM) e confirmadas por citometria de fluxo, cujo resultado demonstrou que mais de 95% das células diferenciadas eram CD11b⁺. Os BMDMs foram infectados independentemente com os quatro sorotipos de DENV (MOI 1:1) e após 12 horas essas células foram infectadas com o ZIKV (MOI 0.1:1). Ao final de mais 12 horas, as células foram analisadas quanto à expressão dos marcadores de ativação de macrófagos, CD80 e CD86, por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A expressão diferencial de genes pró-inflamatórios e anti-viral foi realizada por qPCR. A expressão de *IFN-β* foi diminuída em todos os grupos analisados. Não houve diferença na expressão dos marcadores CD80/CD86 nos BMDMs previamente infectados com DENV seguidos da infecção pelo ZIKV, exceto para o sorotipo 4, foi possível observar um aumento expressivo de ambos marcadores. Contudo, a expressão diferencial tanto de *TNF-α* quanto *IL-1β* foi drasticamente reduzida nesse grupo. Com essa diminuição observou-se o aumento da viabilidade celular frente à diminuição na produção da citocina *TNF-α*. Análises de bioinformática indicaram um possível controle da expressão de *TNF-α* e *IL-1β* pelo mmu-miR-181a-5p, que é induzido pela ativação da via de NF-κB. Para isso, a expressão desse microRNA será avaliada com o objetivo de entender melhor a relação entre ativação de BMDMs pelos marcadores

de superfície CD80/CD86 juntamente com a modulação da ativação de *TNF- α* e *IL-1 β* no modelo de infecção pelo DENV4 seguido da infecção do ZIKV.

Palavras-chave: Dengue. *Zika virus*. Imunidade Inata. Macrófagos. microRNA.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is a RNA virus belonging to *Flaviviridae* family comprising four antigenic distinct serotypes. Dengue is the main arthropod-transmitted virus in the world representing a worldwide public health problem, specially in Brazil, where in 2016 was also registered the greatest outbreak of Zika virus (ZIKV), which shares genomic and structural characteristics to DENV. DENV and ZIKV co-circulation is real in Brazil providing evidences of co-infection. The innate immune response against DENV and ZIKV is mediated by pattern recognition receptors that trigger intracellular signaling to antiviral or inflammatory responses. Regarding that, the main goal of this work is to better understand the innate immunity response to ZIKV by macrophages previously infected to DENV. To access this, bone marrow cells from C57BL/6 mice were derived to macrophages (BMDMs) that were confirmed by flow cytometry with more than 95% of the cells CD11b⁺. BMDMs were infected with the four serotypes of DENV independently for 12 hours following ZIKV infection for more 12 hours. Twenty-four hours post infection, macrophage activation markers CD80 and CD86 were accessed by flow cytometry and fluorescence microscopy. The pro-inflammatory or antiviral expression genes were evaluated by qPCR. *IFN-β* presented to be down-regulated in all analyzed groups. It was not observed differences in CD80 or CD86 expression in ZIKV infected BMDMs previously infected with DENV excepted to serotype 4, where it was observed an augmentation of both activation markers. On the other hand, *TNF-α* and *IL-1β* showed to be down-regulated when compared to non-infected or only DENV4 infected cells. With this decrease the increase in cell viability was observed in relation to the decrease in the production of the cytokine TNF-α. Bioinformatic analysis indicated a putative control of both cytokine expression by mmu-miR-181a-5p which is also up-regulated to innate immunity response. Further experiments will be conducted to evaluate this miRNA expression focusing on to understand the relationship between BMDM activation markers and *TNF-α* or *IL-1β* modulation in DENV4 model of infection followed ZIKV infection.

Key words: Dengue. *Zika virus*. Innate immunity. Macrophages. microRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estados com epidemia de Dengue, no Brasil.....	13
Figura 2 -	Estrutura de microscopia eletrônica cryo do vírus de dengue a 3.5 Å.....	14
Figura 3 -	Estados com epidemia de febre causados pelo vírus da Zika, no Brasil.....	16
Figura 4 -	A estrutura crio-EM do vírus Zika a 3.8Å.....	17
Figura 5 -	Mais de 90% das células derivadas da medula óssea foram marcadas com ANTI-CD11b+.....	40
Figura 6 -	Os BMDMs infectados com ZIKV previamente infectados com DENV apresentaram variação na expressão de CD80 dependente do sorotipo.....	42
Figura 7 -	Os BMDM infectados com ZIKV previamente infectados com DENV apresentaram variação na expressão de CD86 dependente do sorotipo.....	44
Figura 8	Imunofluorescência após 24 horas de infecção pelo ZIKV em BMDM previamente infectados com DENV2 e DENV4	45
Figura 9 -	A expressão de IFN- β é diminuída em todos os grupos durante a infecção de ZIKV em BMDM previamente infectados com DENV, independente do sorotipo.....	46
Figura 10-	A infecção com ZIKV em BMDM previamente infectados pelo DENV4 diminuem a expressão de TNF- α e IL-1 β	47
Figura 11 -	A infecção com ZIKV em BMDM previamente infectados pelo DENV4 aumentaram a porcentagem de células viáveis	49
Figura 12	O mmu-miR-181a-5p é predito interferir com a expressão de TNF- α e IL-1 β	50
Figura 13 -	Modelo proposto de aumento da expressão de CD80/CD86 pelo DENV4/ZIKV, todavia levando a inibição da alça de feedback positivo de NF- κ B-TNF- α -IL-1 β via mmu-miR-181a-5p.....	55

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO	Argonaute
APC	Célula apresentadora de antígenos
BMDM	Macrófagos Derivados da Medula Óssea
CCL	Quimiocina (C-C)
CD80	Aglomerado de diferenciação 80
CD86	Aglomerado de diferenciação 86
CXCL	Quimiocina (C-X-C)
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DC	Célula dendrítica
DENV	Dengue virus
dsRNA	Fita dupla de RNA
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRAK	Quinase 1 associada ao receptor de interleucina
IRF	Fator regulador do interferon
ISG	Genes estimulados pelo IFN
MAVS	Adaptador de sinalização antiviral mitocondrial
MDA5	Proteína 5 Associada à Diferenciação de Melanoma
miRNA	MicroRNAs
MOI	Multiplicidade de infecção
MyD88	Mieloide 88
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos

PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RLR	RIG I Like receptor
ssRNA	Fita simples de RNA
TLR	Toll like receptor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ZIKV	Zika virus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	ARBOVIROSES E O VETOR <i>Aedes aegypti</i> NO CONTEXTO DA TRANSMISSÃO DE DENV E ZIKV	14
2.2	<i>Dengue virus</i>	16
2.3	<i>Zika virus</i>	20
2.4	RESPOSTA IMUNE INATA	23
2.4.1	Resposta imune inata contra DENV	24
2.4.2	Resposta imune inata contra ZIKV	28
2.5	Moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 da imunidade inata	30
2.6	miRNA no contexto de regulação da resposta imune pelos vírus	32
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	37
5.2	AMOSTRAS UTILIZADAS DE DENV E DO ZIKV	37
5.2.1	Produção e titulação de DENV	37
5.2.2	Produção e titulação do ZIKV	38
5.3	CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA	38
5.4	INFECÇÃO DE BMDMs COM ZIKV, PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV	39
5.5	ANÁLISE DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CD80, CD86 e CD11b POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
5.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES CODIFICADORES DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL	40
5.6.1	Extração de RNA total	40
5.6.2	Reação de Transcrição Reversa para síntese de cDNA	40
5.6.3	PCR em tempo real para análise de genes codificadores de citocinas	40
5.7	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	42
5.8	ANÁLISE DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CD86 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	43

5.9	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DE miRNAs CAPAZES DE INTERAGIR COM <i>TNF-α</i> e <i>IL-1β</i>	43
5.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
6	RESULTADOS	45
6.1	MAIS DE 98% DAS CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA FORAM MARCADAS COM ANTI-CD11b ⁺	45
6.2	Os BMDMs INFECTADOS COM ZIKV PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV APRESENTARAM VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CD80 DEPENDENTE DO SOROTIPO	46
6.3	OS BMDM INFECTADOS COM ZIKV PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV APRESENTARAM VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CD86 DEPENDENTE DO SOROTIPO	49
6.4	A EXPRESSÃO DE <i>IFN-β</i> É DIMINUÍDA EM TODOS OS GRUPOS DURANTE A INFECÇÃO DE ZIKV EM BMDM PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV, INDEPENDENTE DO SOROTIPO.....	53
6.5	A INFECÇÃO COM ZIKV EM BMDM PREVIAMENTE INFECTADOS PELO DENV4 DIMINUEM A EXPRESSÃO DE <i>TNF-α</i> E <i>IL-1β</i>	54
6.6	A INFECÇÃO COM ZIKV EM BMDM PREVIAMENTE INFECTADOS PELO DENV4 AUMENTARAM A PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.....	56
6.7	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA DEMONSTRARAM QUE 2799 miRNAs PODEM INTERAGIR COM OS GENES PRÓ-INFLAMATÓRIOS <i>TNF-α</i> e <i>IL-1β</i>	57
6.7.1	O mmu-miR-181a-5p é predito interferir com a expressão de <i>TNF-α</i> e <i>IL-1β</i> . .	58
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do DENV em 1943, a incidência relatada da infecção por este vírus aumentou nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (MESSINA et al., 2014). O DENV, pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, possui quatro sorotipos. A infecção por DENV é considerada uma arbovirose que acarreta em uma preocupação de saúde global porque sua área endêmica abrange mais de 128 países. Além disso, estima-se que o DENV cause mais de 390 milhões de casos de infecção anualmente, com cerca de 2 milhões de indivíduos apresentando manifestações clínicas severas, enquanto que desses, 20.000 casos terminam em morte (BHATT et al., 2013; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013). No Brasil até a semana epidemiológica 28 de 2018 e somando os anos de 2016 e 2017 foram registrados 1.904.506 casos de infecção pelo DENV (BRASIL, 2018a).

Em 2011, a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou suas classificações e agora classifica a gravidade da doença por meio de suas manifestações clínicas como dengue clássica ou febre hemorrágica da dengue das classes 1 a 4 (WHO, 2011). As manifestações severas da infecção por DENV apresentam várias características, incluindo extravasamento vascular e trombocitopenia grave, que podem levar ao choque hipovolêmico e à falência de vários órgãos (GOMES et al., 2014). Atualmente, há uma vacina contra a dengue registrada em vários países (CYD-TDV ou Dengvaxia®) considerada como tetravalente viva atenuada (recombinante) representando os sorotipos 1, 2, 3 e 4 (PRECIOSO et al., 2015).

Como o DENV, o ZIKV também pertence ao gênero *Flavivirus*, é uma arbovirose transmitida pelo mesmo mosquito vetor, o *Aedes* spp. O primeiro isolamento deste patógeno, considerado como negligenciado, ocorreu em 1947. As apresentações clínicas mais comuns da infecção com este vírus incluem doença semelhante ao quadro gripal, conjuntivite, erupção cutânea, artralgia e dor nas articulações (PAIXÃO et al., 2016; SAVIDIS et al., 2016a). A partir de abril de 2015, houve um surto de ZIKV no Brasil, que incluiu aproximadamente 500 casos. A epidemia continuou no Caribe, bem como na América Central e do Sul. Em janeiro de 2016, esta disseminação levou os Centros de Controle de Doenças dos Estados Unidos a anunciar um alerta de nível 2 para viajar para áreas de epidemia de ZIKV (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; SCHMIDT, 2016; TEIXEIRA et al., 2016).

A co-circulação de DENV e ZIKV é realidade no Brasil, onde vários estados já confirmaram a incidência de casos dos dois vírus em questão fornecendo evidências, inclusive, da existência de uma co-infecção de DENV-ZIKV na região nordeste do Brasil (PESSÔA et al., 2016). Além disso, o inseto vetor de ambos vírus, *Aedes aegypti*, é altamente permissivo a monoinfecção e coinfeção com DENV e ZIKV e é capaz de co-transmitir ambos os arbovírus, como demonstrado através de um modelo de transmissão por picada (CHAVES et al., 2018).

Até o momento, muito do que se sabe sobre a resposta imune contra os vírus em questão são de estudos provenientes com o DENV. A infecção por DENV inicia-se pela entrada do vírus nas células dendríticas (DC) resultando em maturação de DC e altos níveis de secreção de citocinas, expressão de quimiocinas, polarização de uma resposta imune celular adaptativa do perfil TH1 e essas respostas dependem, diretamente, da replicação do RNA viral (SPROKHOLT et al., 2017). A replicação do vírus e a sua íntima relação com a maquinaria celular do hospedeiro ativa uma série de receptores da imunidade inata que culminam com a expressão de citocinas pró-inflamatórias que muitas vezes estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento dos sintomas desta infecção (COSTA et al., 2013).

As citocinas e quimiocinas TNF- α , IL-6, IL-8, CCL2, CCL3, CXCL10, e IFN- γ nas infecções primárias e secundárias com DENV em humanos e em camundongos atuam de forma protetora como no caso de IFN- γ precedido pela expressão de IL-12 e IL-18 (COSTA et al., 2012; FAGUNDES et al., 2011). Contudo, pacientes que desenvolveram a febre hemorrágica da dengue não apresentaram IL-12 em nível sérico (PACSA et al., 2000). Já a TNF- α , citocina relacionada no aumento da permeabilidade vascular, atua na evolução da dengue para formas mais severas, por exemplo, na dengue hemorrágica.(CARDIER et al., 2005; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Apesar de grandes esforços em se obter as informações sobre a resposta imune e o desenvolvimento das doenças mediadas pelos DENV e ZIKV, nenhuma informação sobre a co-infecção e o papel da imunidade inata neste processo foi descrita. A maioria dos trabalhos tem evidenciado o papel da imunidade adaptativa, muitas vezes pela mensuração da produção de anticorpos circulantes em pacientes infectados, durante a infecção por um dos dois vírus. Recentemente, foi avaliada a co-infecção pelos DENV e ZIKV em seres humanos e foi determinado que uma infecção prévia por dengue não leva necessariamente a um quadro mais grave de Zika

(CAROLINA et al., 2017). Estudos anteriores, *in vitro*, sugeriam que ter tido uma infecção por dengue potencializa o agravamento da Zika por facilitar a multiplicação do vírus. A suspeita que essa possível amplificação viral ocorra poderia explicar a concentração de casos de microcefalia associada à Zika registrada no Nordeste brasileiro, onde a prevalência de dengue é mais elevada do que em outras regiões do país (DEJNIRATTISAI et al., 2016).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune inata após infecção pelo ZIKV em macrófagos, previamente infectados com DENV. Utilizando de cultura de macrófagos derivados da medula óssea murina, essas células foram infectadas com ZIKV, previamente infectadas, independentemente com os quatro sorotipos de DENV. Os resultados deste trabalho demonstram que não houve diferença na expressão dos marcadores CD80/CD86 nos BMDMs previamente infectados com DENV seguidos da infecção pelo ZIKV, exceto para o sorotipo 4. Verificou-se a diminuição da expressão de genes antivirais, *IFN- β* , em todos os grupos em relação aos NI.

Mas observou-se que quando o DENV4 infecta macrófagos ocorre o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios *TNF- α* e *IL-1 β* . Porém quando co-infecta com ZIKV a expressão desses genes é diminuída. Com essa diminuição foi observado que a viabilidade celular aumentou no grupo DENV4/ZIKV devido à queda da expressão dos genes pró-inflamatório. Como visto pelo nosso grupo de pesquisa e por ambos os genes poderem apresentar a interferência do mmu-miR-181a-5p, como descrito pelos dados da bioinformática, supõe-se que a diminuição dos genes, *TNF- α* e *IL-1 β* , possam ter como interferente esse miRNA. Sendo assim, estudos futuros de expressão desse miRNA poderão demonstrar a modulação da resposta imune inata frente à infecção pelo ZIKV em macrófagos previamente infectados pelo DENV4.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após revisão crítica da literatura, neste tópico serão apresentadas as principais informações que foram pertinentes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 ARBOVIROSES E O VETOR *Aedes aegypti* NO CONTEXTO DA TRANSMISSÃO DE DENV E ZIKV

As arboviroses são causadas por vírus que são transmitidos às pessoas pela picada de um artrópode infectado, predominantemente mosquitos e carrapatos. Nos últimos 50 anos, o surgimento inédito de doenças epidêmicas causadas pelos arbovírus mudou a percepção sobre sua contribuição para a mortalidade global e a incapacitação de milhares de pessoas (MURRAY, 2015). Por serem transmitidos de animais para os homens, as arboviroses possuem caráter zoonótico (KUNO et al., 2005; WEAVER; REISEN, 2010). Sendo assim, o termo arbovírus não é um indicador taxonômico viral e sim descreve a necessidade de um vetor em seu ciclo de transmissão (KARABATSOS, 1985; KING et al., 2012).

No ano de 1985 foi criado o Catálogo Internacional de Arbovírus (KARABATSOS, 1985). A partir de 1992, 535 espécies pertencentes a 14 famílias de vírus foram registradas neste catálogo. Enquanto muitos arbovírus atuais não se classificam como patógenos humanos ou animais, o grande número de arbovírus altamente diferentes e adaptáveis proporciona uma preocupação para a emergência de novos patógenos no futuro. Além da evolução das estratégias de sobrevivência a longo prazo, os arbovírus possuem uma enorme variedade de espécies de artrópodes potencialmente susceptíveis de serem infectadas. Aproximadamente 300 tipos de mosquitos podem transmitir arboviroses, cujos mosquitos *Aedes* e *Culex* são os gêneros mais frequentemente associadas à transmissão de arbovírus, 115 e 105 tipos de arbovírus, respectivamente (GUBLER, 2002)

Mais de 100 espécies de arbovírus que causam doenças humanas/animais têm sido identificadas. Quatro famílias de vírus, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Reoviridae*, contêm a maioria dos arbovírus que causam doenças humanas/animais sendo que algumas infecções arbovirais resultam em um grande ônus social e econômico (KARABATSOS, 1985). Os seres humanos e animais infectados por arbovírus podem apresentar sintomas e doenças que podem ser classificadas como

subclínicas ou leves até estados febris a hemorrágicas, com uma proporção significativa de mortes (LIANG; GAO; GOULD, 2015). Uma vez que a epidemia tenha completado seu curso, o vírus sobrevive por meio de seu ciclo de vida silvestre, que pode envolver uma grande variedade de espécies. Alternativamente, os arbovírus podem ser mantidos por meses ou até mesmo anos em ovos de mosquito que permanecem adormecidos até a estação chuvosa e desencadear a eclosão das novas larvas infectadas de mosquitos (GOULD; SOLOMON, 2008).

Dentre os vetores de arbovírus de maior interesse atualmente no Brasil está o *Aedes aegypti*, por ser um dos principais transmissores do DENV e do ZIKV em espaço urbano. A transmissão também pode ocorrer através de um outro vetor do mesmo gênero, o *Aedes albopictus*. O *A. aegypti* é uma espécie cosmotrópica distribuída em todo o mundo entre 35° N e 35° S, latitudes que correspondem aproximadamente a uma isoterma de inverno 10°C, que parece ser o limite para o que as espécies possam sobreviver durante a passagem do ciclo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Esta espécie é altamente adaptada aos ambientes urbanos, procriando em água estagnada encontrada em recipientes manufaturados, pilhas de lixo e pneus. Os mosquitos fêmeas infectados transmitem o vírus, e os mosquitos fêmeas não infectada de DENV que se alimentam de um hospedeiro infectado, após um período de incubação de 4 a 10 dias, permanecerão infecciosos durante o período de vida (WHO), 2016).

A fêmea *A. aegypti* prefere alimentar logo após o amanhecer ou pouco antes do pôr-do-sol, e é um alimentador promíscuo capaz de picar múltiplos indivíduos em um curto período, resultando em grupos de infecções no mesmo domicílio (ASIA, 2011). Devido ao alcance limitado dos vetores mosquitos, cerca de 500 metros, o movimento dos seres humanos infectados em suas famílias e comunidades é provavelmente a grande causa da propagação do vírus (ASIA, 2011; MAMMEN et al., 2008). O vetor não é absolutamente necessário para a transmissão, pois alguns casos da dengue foram atribuídos a transfusão de sangue, contato mucocutâneo, transmissão vertical de mãe para criança e, em um caso, através de transplante de medula óssea, embora esses eventos não sejam relatados como de interesse epidemiológico (CHEN; WILSON, 2004, 2010; DE WAZIÈRES et al., 1998; LANTERI; BUSCH, 2012; NEMES et al., 2004).

Alternativamente, as abordagens de modelagem recentes sugeriram que *A. albopictus* pode ser ainda mais eficiente do que *A. aegypti* na transmissão da dengue,

particularmente quando se considera a vida útil mais longa dessa espécie de mosquito (BRADY et al., 2014). Alguns teorizaram que *A. albopictus* está implicado na manutenção do ciclo silvestre, ciclos de transmissão rural em áreas endêmicas e, portanto, é menos adaptado ao ambiente urbano do que *A. aegypti* (GRATZ, 2004). O *A. albopictus* se espalhou globalmente e agora está amplamente distribuído nas Américas (excluindo o Canadá), Europa, Ásia, África, Austrália e Pacífico (ROGERS et al., 2006).

2.2 Dengue virus

A dengue é a principal doença viral transmitida por artrópodes no mundo e representa um importante problema de saúde humana global. O DENV é endêmico em mais de 128 países com até 3,9 bilhões de pessoas em regiões tropicais do mundo em risco de infecção (WHO, 2016). O DENV expandiu sua gama global, com surtos sustentados na América do Sul e reintrodução na América do Norte através da Flórida e do Texas (HALSTEAD, 2008; ROTHMAN, 2011; WILDER-SMITH et al., 2010). Estima-se que 400 milhões de pessoas sejam afetadas a cada ano, com casos sintomáticos que variam desde febre leve até febre hemorrágica de dengue e síndrome do choque da dengue.

A incidência de dengue aumentou significativamente nos últimos 50 anos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. O número real de casos de dengue é subnotificado e muitos casos são classificados erroneamente. Uma estimativa recente indica 390 milhões de infecções por dengue por ano, das quais 96 milhões se manifestam clinicamente (com qualquer gravidade da doença) e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 20.000 por ano (BHATT et al., 2013).

No Brasil, entre os anos de 2016, 2017 e até a semana epidemiológica 28 foram registrados 1.904.506 casos de infecção pelo DENV. (BRASIL, 2018a). A disseminação da DENV tem sido atribuída a vários fatores, incluindo o aumento da densidade populacional em áreas urbanas, as viagens e o ressurgimento de seus mosquitos vetores. A dengue é um problema especialmente crescente nas Américas (GUZMAN et al., 2010), sendo que aproximadamente 70% de todos os casos de dengue relatados nas Américas ocorrem no Brasil. Em 2010, o Brasil registrou 1,4 milhão de casos de dengue, o maior número de casos entre os países do hemisfério sul (CHEN; WILSON, 2010).

O Brasil é uma zona de grande importância epidemiológica da dengue (Figura 1). Nesse país, a introdução do DENV é relativamente recente e não atingiu um estado de equilíbrio estável. Os surtos de dengue no Brasil são dinâmicos, com ondas de diferentes sorotipos (DENV-1 a DENV-4) espalhados por todo o país em diferentes momentos. A epidemia de dengue nas Américas é distinta do Sudeste Asiático, refletida em diferentes proporções de casos leves a severos. No Sudeste Asiático, uma incidência muito maior de doenças graves foi relatada (aproximadamente 18 vezes maior em relação ao Brasil), atingindo também crianças mais velhas e adultos jovens, possivelmente devido a mudanças no crescimento da população, e infecções secundárias.

Nas Américas, a dengue hemorrágica ocorre em uma menor proporção de jovens adultos. Recentemente, houve uma nova tendência nas Américas em direção a um padrão epidemiológico mais semelhante ao observado no Sudeste Asiático, com circulação hiperendêmica de todos os sorotipos descritos do DENV (SAN MARTÍN et al., 2010).

Os casos nas Américas, no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental ultrapassaram 1,2 milhão em 2008 e mais de 3,2 milhões em 2015 (com base em dados oficiais apresentados pelos Estados Membros). Recentemente, o número de casos relatados continuou a aumentar. Em 2015, foram registrados 2,35 milhões de casos de dengue apenas nas Américas, dos quais 10.200 casos foram diagnosticados como dengue grave, causando 1181 mortes (WHO, 2016).

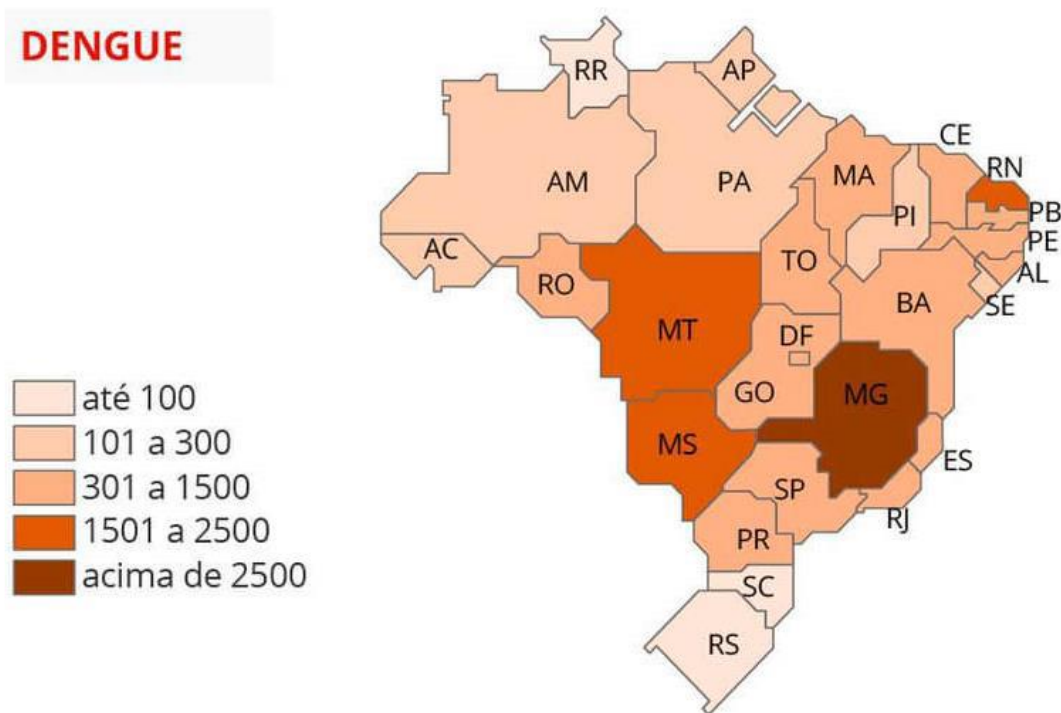


Figura 1 - Estados com epidemia de Dengue, no Brasil (Incidência por 100 mil habitantes). É observado que Minas gerais apresenta a maior incidência de casos de dengue no Brasil, seguido de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Norte. Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentam a menor incidência. Até 10/12/2016.

Fonte: (BRASIL, 2017a)

O DENV é um vírus de RNA de cadeia simples e de sentido positivo da família *Flaviviridae* que é composta por quatro sorotipos relacionados, antigênicamente distintos (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; HALSTEAD, 2008; ROTHMAN, 2011; WILDER-SMITH et al., 2010). Os sorotipos de DENV (DENV-1 a DENV-4), que co-circulam em regiões tropicais e subtropicais, diferem um do outro em pelo menos 25% no nível de aminoácidos dos seus constituintes virais (ENFISSI et al., 2016).

O DENV possui um genoma de 10,7 kb com regiões 5' e 3' não traduzidas flanqueando uma sequência capaz de codificar uma poliproteína que por sua vez codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), precursor da membrana (prM)/membrana (M) e envelope (E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Entre as proteínas estruturais, as proteínas prM e E são os alvos antigênicos primários da resposta imune humoral em seres humanos (BELTRAMELLO et al., 2010; DE ALWIS et al., 2011; DEJNIRATTISAI et al., 2010) (Figura 2).

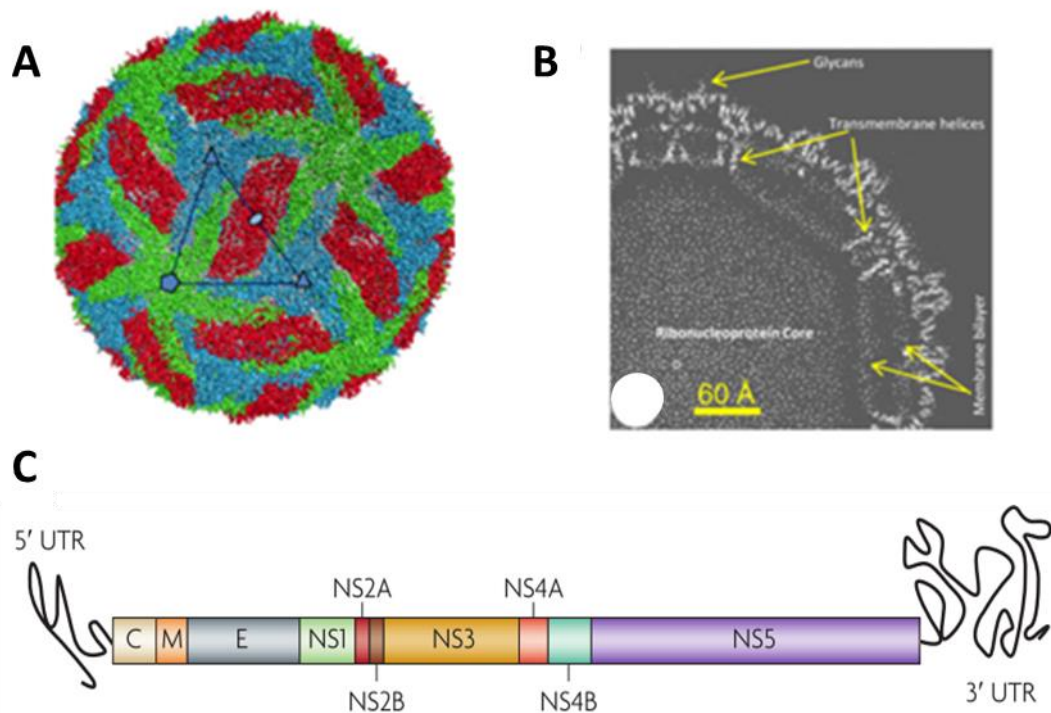


Figura 2 - Visão geral da estrutura de microscopia eletrônica cryo (cryoEM) do vírus de dengue a 3.5 Å. **A:** Renderização da superfície do mapa de densidade cryoEM. O vírion maduro da dengue tem uma superfície externa icosaédrica lisa coberta pela proteína E com a proteína M por baixo. Os heterodímeros E: M da mesma cor são equivalentes pela simetria icosaédrica. heterodímeros de cores diferentes são quase equivalentes, dímeros verdes, E: M, rodeiam nos eixos icosaédricos 5 vezes (forma de estrela do mar), azul rodeiam 3 vezes (marcado pelo pequeno triângulo) e vermelho rodeiam 2 vezes (marcado por uma forma oval). **B:** A bicamada de membrana parece mais poligonal do que circular, com hélices transmembranares em seus cantos. **C:** O genoma da poliproteína dos flavivirus. O quadro de leitura aberto único codifica três proteínas estruturais C, M E e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

Fonte: modificado de (ZHANG et al., 2013) e (GUZMAN et al., 2010)

A dengue pode se manifestar desde de uma doença assintomática ou subclínica até a forma mais grave da doença que inclui a febre hemorrágica e o choque séptico (SHURTLEFF et al., 2001; SILVA et al., 2008; VASILAKIS; WEAVER, 2008; ZHOU et al., 2006). A dengue grave é frequentemente associada a uma infecção secundária por um sorotipo diferente. E se manifesta como choque hipovolêmico, levando danos aos órgãos, coagulopatia e sangramento. Uma categoria adicional de doença, denominada de dengue com complicações representa aproximadamente 40% dos casos de internações hospitalares (HALSTEAD, 2007).

2.3 *Zika virus*

Desde o grande surto em 2007, o ZIKV se espalhou rapidamente por toda a América do Sul, América Central e Caribe, e cada vez mais há relatos de correlação entre a infecção por este vírus e distúrbios neurológicos, como a microcefalia, condição em que o cérebro fetal não se desenvolve adequadamente, e também tem sido associado à síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune (ALCANTARA; O'DRISCOLL, 2014; ANSAR; VALADI, 2015; PETERSEN et al., 2016). A gravidade das doenças associadas com o ZIKV e sua rápida disseminação provocaram uma necessidade urgente de compreender a biologia e a patogênese desse vírus.

O ZIKV foi isolado, primeiramente, em 1947 de um macaco rhesus sentinela em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Em 1952, foi encontrado em seres humanos e foi ligado à doença de Zika em 1964 (SIMPSON, 1964). No entanto, pouca atenção foi dada a este vírus até 2007, quando um surto de "doença semelhante a dengue" foi relatado no estado Yap na Micronésia. Outro surto ocorreu em 2013 na Polinésia Francesa e posteriormente em outras regiões do Pacífico (HANCOCK; MARFEL; BEL, 2014). Também ocorreram surtos na Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa, (TOGNARELLI et al., 2016). Até 2018, na semana epidemiológica 28 e somando os anos de 2016 e 2017 o surto de ZIKV no Brasil é o maior já registrado, com aproximadamente 239.018 casos confirmados (BRASIL, 2018b) (Figura 3).

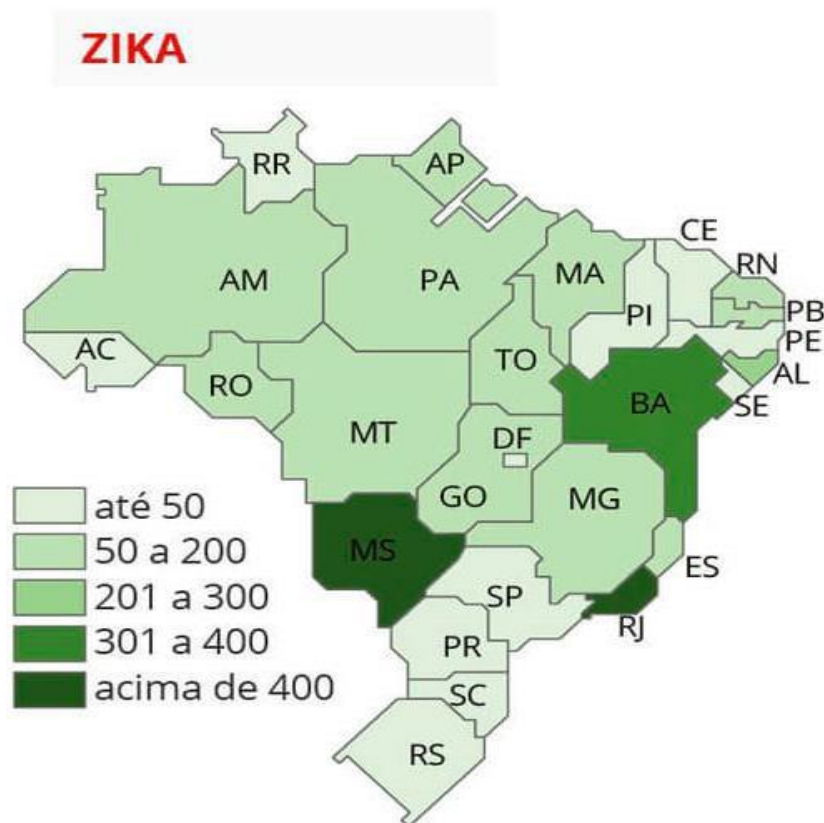


Figura 3 - Estados com epidemia de febre causados pelo vírus da Zika, no Brasil. Mato Grosso do Sul, Bahia e Rio de Janeiro são os Estados brasileiros com a maior incidência de Zika (Incidência /100 mil habitantes). Até 10/12/2016.

Fonte:(BRASIL, 2017b)

Estruturalmente, o ZIKV (Figura 4) é semelhante ao DENV, com um genoma de RNA de cadeia simples de sentido positivo de 10,7 kB, codificando uma única poliproteína constituída por proteínas estruturais e não estruturais. A poliproteína 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', é clivada em proteínas do capsídeo (C), precursora de membrana (prM), do envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (FAYE et al., 2014).

Diferente do DENV, o ZIKV parece ser composto de apenas um sorotipo (TAPPE et al., 2016), e as comparações genéticas globais identificaram achados que refletem duas linhagens: africana e asiática (KELSER, 2016). A análise filogenética de uma cepa brasileira recentemente isolada indicou que também foi derivada da linhagem asiática, com duas substituições de aminoácidos em NS1 e NS4B (MLAKAR et al., 2016). A estrutura de ZIKV é semelhante a outras estruturas conhecidas de flavivírus, exceto para um mapeamento de região em torno do local de glicosilação na

proteína E. Em contraste com DENV, que possui dois locais de glicosilação em Asn67 e Asn153, ZIKV possui um único local de glicosilação (Asn 154) que, dependendo da composição de porções de carboidratos, poderia contribuir para um tropismo celular distinto para este patógeno (SIROHI et al., 2016).

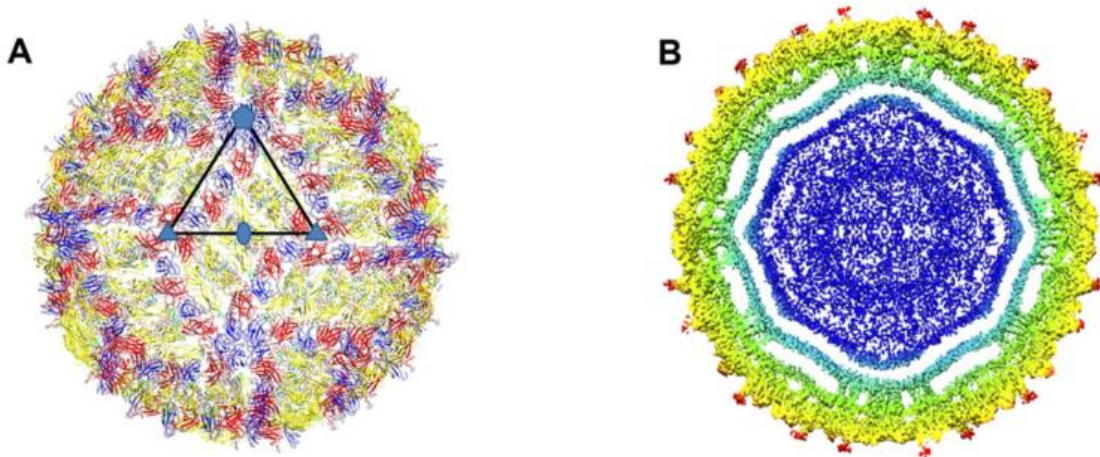


Figura 4 - A estrutura crio-EM do vírus Zika a 3.8Å. **A:** O esqueleto C α das proteínas E e M na partícula icosaédrica ZIKV mostrando a organização do espinha de garfo. O código de cor se encaixa na designação padrão de domínios de proteína E I (vermelho), domínio II (amarelo) e domínio III (azul). **B:** Uma seção transversal de ZIKV mostrando a distribuição de densidade radial. A região mostrada em azul não segue a simetria icosaédrica e, portanto, sua densidade é ininterrupta como é o caso de outros flavivírus.

Fonte: modificado de (SIROHI et al., 2016)

De certa forma, as características clínicas da infecção por ZIKV se assemelham à dengue. Os sintomas geralmente são leves e facilmente confundidos com dengue, chikungunya ou outras doenças virais semelhantes à gripe. Antes das recentes epidemias, acreditava-se que o ZIKV causava apenas uma doença leve com erupção cutânea, febre baixa, artralgia, mialgia, dor de cabeça e conjuntivite sendo os sintomas mais comuns (MLAKAR et al., 2016; MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015). As características de laboratório associadas à infecção por ZIKV incluem leucopenia, trombocitopenia e elevação de múltiplos parâmetros inflamatórios (proteína C-reativa, fibrinogênio e ferritina) (ZAMMARCHI et al., 2015).

Os sintomas da infecção pelo ZIKV geralmente se resolvem após 3-7 dias, mas a artralgia pode persistir por meses. No entanto, desde o surto na Polinésia Francesa em 2013, e ainda mais dramaticamente durante o surto atual no Brasil, foram observados sintomas mais graves. Durante o surto ZIKV na Polinésia Francesa, 42 casos de síndrome de Guillain-Barré foram observados estarem associados à

infecção pelo vírus, enquanto que a propagação da epidemia no Brasil tem sido associada a um aumento substancial na síndrome de Guillain-Barré e na quantidade de recém-nascidos com microcefalia (CAO-LORMEAU et al., 2016; MALKKI, 2016).

Em 2015, foram notificados 4.700 novos casos suspeitos de microcefalia no Brasil, com prevalência de 99,7 por 100.000 nascidos vivos (VENTURA et al., 2016). A detecção de ZIKV no líquido amniótico de fetos com microcefalia sugeriu fortemente um modo de transmissão intrauterino (DRIGGERS et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016). Estudos subsequentes de lactentes detectaram genomas completos de ZIKV em cérebros do feto e, em conjunto, esses estudos contribuíram para a associação agora reconhecida de infecção por ZIKV com microcefalia em recém-nascidos (DRIGGERS et al., 2016; MLAKAR et al., 2016). Além disso, em um estudo retrospectivo sobre o surto da Polinésia Francesa, reforçou esses achados com a observação de que o maior risco de transmissão fetal ocorre durante o primeiro trimestre de gravidez (CAUCHEMEZ et al., 2016).

2.4 RESPOSTA IMUNE INATA

As células de mamíferos detectam características únicas de invasores, por exemplo os agentes patogênicos virais, através de uma rede inata de vigilância imune complexa composta por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) ligados à membrana e citosólico (CHAN; GACK, 2016; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Múltiplos PRRs trabalham em conjunto para detectar infecções virais ao reconhecer ácidos nucleicos, proteínas e/ou carboidratos virais, comumente denominados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), neste caso virais.

Além disso, alguns PRRs percebem os "sinais de perigo" identificados pelo hospedeiro (também chamados padrões moleculares associados ao dano [DAMPs]) que são produzidos pela célula após a infecção viral. Pelo menos duas grandes classes de PRRs contribuem para a detecção eficiente da infecção por ZIKV e DENV em células humanas: os receptores RIG-I-like (RLRs) e receptores Toll-like (TLR) que ao reconhecer os PAMPs virais ativam cascatas de sinalização que induzem genes antivirais ou pró-inflamatórios, incluindo citocinas, como o interferon tipo I (IFN- α e IFN- β), quimiocinas e genes estimulados pelo IFN (ISGs) (GACK; DIAMOND, 2016).

2.4.1 Resposta imune inata contra DENV

A infecção por DENV inicia-se pela entrada do vírus nas células dendríticas (DC) resultando em maturação de DC e altos níveis de secreção de citocinas, expressão de quimiocinas, polarização de uma resposta imune celular adaptativa do perfil TH1. Essas respostas dependem, diretamente, da replicação do RNA viral (SPROKHOLT et al., 2017). A infecção de DCs por DENV não requer, somente, a molécula DC-SIGN, uma lectina do tipo C de membrana, pois o vírus também pode entrar na célula a ser infectada por endocitose (LOZACH et al., 2005). O DENV também utiliza o homólogo L-SIGN de DC-SIGN para infectar células endoteliais do fígado (DEJNIRATTISAI et al., 2011). Além de DC-SIGN e L-SIGN, o receptor de manose expresso em macrófagos humanos foi mostrado como local de ligação com as porções de carboidratos na glicoproteína do envelope DENV (MILLER et al., 2008).

Em células que não possuem receptores do tipo selectina, estudos recentes mostraram que o DENV utiliza os receptores transmembranares TIM e TAM, dois receptores envolvidos na remoção dependente de fosfatidilserina em células em apoptose. O TIM liga a DENV diretamente, enquanto a TAM interage indiretamente com DENV através de duas proteínas de ponte, Gas6 e ProS (MEERTENS et al., 2012).

Em amostras de sangue periférico de pacientes infectados com DENV, os monócitos foram identificados como os principais hospedeiros do DENV (DURBIN et al., 2008). Em amostras de biópsia de pele de doadores humanos não infectados, células de Langerhans, células dendríticas e macrófagos podem servir como hospedeiros celulares para DENV (CERNY et al., 2014; WU et al., 2000). Da mesma forma, nos baços de doadores humanos não infectados, os macrófagos são as células alvo da infecção por DENV *in vitro* (BLACKLEY et al., 2007).

De acordo com estudos em humanos, análises detalhadas de tropismo celular em camundongos altamente suscetíveis sem sinalização do receptor de interferon tipo I demonstraram que tanto células dendríticas dérmicas quanto macrófagos na pele (SCHMIDT, 2016), mas principalmente macrófagos em outros órgãos linfoides (baço, linfonodos, timo, medula óssea, placas de Peyer) e tecidos não linfoides (rim, coração, pulmão e trato gastrointestinal) são os principais hospedeiros celulares do DENV. Assim, estudos com modelos em humanos e em roedores até à data indicam células da linhagem de células de monócitos, macrófagos e dendríticas como os principais

hospedeiros de DENV na pele e muitos órgãos linfóides e não linfóides (PRASAD et al., 2017; PRESTWOOD et al., 2012a; ZELLWEGER; PRESTWOOD; SHRESTA, 2010).

A interação em nível de membrana das células que estão sendo infectadas ou na membrana de endossomos, pode acarretar no reconhecimento dos PAMPs virais por receptores TLRs. Os TLRs desencadeiam resposta distintas, totalmente dependentes da associação com uma combinação diferente com quatro adaptadores contendo o domínio TIR (MyD88, TIRAP/MAL, TRIF, TRAM), utilizando de interações homofílicas desses domínios. O fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), é uma molécula adaptadora de todos os TLRs, exceto TLR 3. MyD88 quando associado ao TLR, essa recruta as proteínas IRAK-1 (*IL-1R-associated kinase-1*), IRAK-4 e TRAF6 em um complexo. IRAK-1 e TRAF6 se dissociam e interagem com TAK1 levando a ativação desta cinase. Então com a TAK1 ativada, atua fosforilando IKK-b (I κ B cinase), e MAPcinase cinase 6 (MKK6) culminado com a degradação de I κ B. Esses eventos deixa o fator nuclear κ B (NF- κ B) livre para ser translocado até o núcleo, fazendo com que ative múltiplos genes de citocinas pró-inflamatórias: como *IL-12* e *TNF- α* . (UEMATSU; AKIRA, 2008).

O receptor TLR3, presente nos endossomos, entretanto, possui a capacidade de utilizar uma via que independe do adaptador MyD88 (Yamamoto et al., 2003), mediada pelo adaptador TRIF, com resultados distintos. Essa via é capaz de induzir a fosforilação de elementos reguladores de interferon (IRFs), como IRF3, culminado na produção de interferon do tipo I, em particular IFN- β (Fitzgerald et al 2003), assim ativa-se genes induzidos por interferon, como IP10, CXCL10 e genes associados a maturação de DCs (ALBIGER et al., 2007; UEMATSU; AKIRA, 2008).

Durante o envolvimento de TLR7, MyD88 é recrutado e forma um complexo com quinases 1 e 4 associadas a receptores de IL-1 (IRAK1 e IRAK4), TRAF3 e TRAF6. Esses complexos estimulam a MAPK, IKK e TBK, que ativam e promovem a translocação nuclear dos fatores de transcrição da proteína ativadora 1, NF- κ B, IRF3 e IRF7, resultando na indução da expressão de IFN-I, citocina pró-inflamatória e quimiocina (HEMMI et al., 2002; KAWASAKI; KAWAI, 2014; LIN; LO; WU, 2010; MODHIRAN et al., 2017; VON BERNUTH et al., 2012; ZHOU et al., 2013). Portanto, a ativação de TLR3 ou TLR7 promove a secreção de IFNs e citocinas pró-inflamatórias. A ativação de TLR3 e TLR7 está envolvida na resposta imune contra flavivírus; estas proteínas reconhecem motivos ricos em uridina contendo dsRNA e

ssRNA, respectivamente. No entanto, estruturas altamente ordenadas contendo RNA viral aumentam as respostas de TLR7 ao ssRNA (DIEBOLD et al., 2004; LUND et al., 2004; WANG et al., 2006).

Em conjunto com TLRs, as helicases citoplasmáticas detectam RNA no citoplasma. Tanto o gene I induzível pelo ácido retinoico (RIG-I) quanto o gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA5), reconhecem dsRNA, são induzidos durante a infecção por DENV e estão envolvidos na indução de IFN- β (LOO et al., 2008; NASIRUDEEN et al., 2011).

Estudos indicam que o IFN- β induzido por RIG-I-like receptor (RLR) limita a infecção por DENV em DCs e é crucial para a maturação de DC induzindo sinalização via o receptor de interferon do tipo I (IFN- α/β R) (WU et al., 2017). Os receptores RIG-I-like (RLRs), que reconhecem o RNA viral citosólico (LOO; GALE, 2011), emergiram como sensores críticos para vírus de RNA, incluindo ZIKV (SUTHAR; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2013). A ligação do RNA viral desencadeia mudanças de conformação de RIG-I que expõe seus domínios CARD para interação subsequente com o adaptador de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) (SETH et al., 2005). Isso, por sua vez, permite o recrutamento de quinase de ligação TANK 1 ao sinal e fosforilação do IRF3 para iniciar transcrições IFN de tipo I (LIU et al., 2015). Após a ligação a duas subunidades de receptores de IFN (IFNAR1 e IFNAR2), o IFN de tipo I transduz o sinal através das quinases Janus (Jak1 e Tyk2) e transdutores de sinal de transcrição (STAT1 e STAT2), levando à indução dos ISGs, que estabelece o estado antiviral das células. As respostas de IFN de tipo I induzidas por MAVS são iniciadas por IRF3 e prolongadas por IRF7 induzido por IFN- α / β R.

Curiosamente, o IRF7 é um fator de transcrição do CD86 (LIM et al., 2005), indicando que os RLRs podem induzir a maturação DC através da expressão de IRF7 dependente de IFN- α / β R durante a infecção por DENV. Como a maturação DC é crucial para induzir respostas imunes adaptativas, o IFN-I não é apenas envolvido na supressão inata da replicação DENV, também pode desempenhar um papel nas respostas de células T adaptativas. Além disso, a importância da sinalização de IFN- α/β R na maturação de DC pode explicar a diferença na maturação entre DCs infectadas e não infectadas (PALMER et al., 2005; RODRIGUEZ-MADOZ et al., 2010).

Paralelamente às respostas mediadas por IRF3, a ativação de RLR leva à ativação de NF- κ B via domínio de reconhecimento de carboidratos (CARD), CARD9 e Bcl-10 (POECK et al., 2010). A ativação de NF- κ B é essencial para a expressão da

maioria das citocinas, incluindo a IL-1 β , que induz fortemente a febre, sinal amplamente observado em indivíduos que desenvolvem a dengue clássica e a hemorrágica (DINARELLO, 2011; NETEA; KULLBERG; VAN DER MEER, 2000). A expressão de IL-1 β é rigorosamente regulada e exige que um processo de vários estágios seja funcionalmente ativo. Os sinais primários induzem transcrição e tradução de pro-IL-1 β , enquanto os sinais secundários induzem a ativação do inflamassoma para processar pro-IL-1 β em IL-1 β madura por caspases. Normalmente, a síntese de pró-IL-1 β e a ativação do inflamassoma são induzidas por sinais separados, e apenas alguns receptores têm a capacidade de fornecer ambos os sinais (GRINGHUIS et al., 2012).

Nos macrófagos humanos, CLR CLEC5A é necessária para a expressão de NLPR3 e ativação subsequente de inflamassomos, em resposta ao DENV (WU et al., 2013). Em contraste, o RIG-I pode induzir a expressão de pro-IL-1 β e associar-se à molécula adaptadora inflamatória de ASC para induzir o processamento de IL-1 β pela caspase 1 (POECK et al., 2010). Foi observado que a infecção por DENV de DCs resultou na expressão de pro-IL-1 β e que DCs não exigiram sinais de iniciação para secreção eficiente de IL-1 β . Notavelmente, a indução de pro-IL-1 β , bem como a secreção de IL-1 β maduras, dependeram de RIG-I e MDA5. Como a IL-1 β também é um potente indutor de vasodilatação (HOTTZ et al., 2013), a inibição da ativação do inflamassoma dependente de RLR tem potencial para amenizar a dengue hemorrágica. Além das citocinas, a infecção pelo DENV de DCs resultou em expressão robusta de quimiocinas de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5. CCL2 e CCL4 são quimiostáticos fortes para monócitos, enquanto o CCL3 atrai potentemente neutrófilos para locais de inflamação.

No início da infecção por DENV, os monócitos são recrutados para a pele onde eles se diferenciam em macrófagos e, assim, aumentam o grupo de células susceptíveis para DENV (SCHMID; HARRIS, 2014). Isso poderia levar a um ciclo auto-sustentado em que DCs infectados por DENV atraem monócitos que se diferenciam em DCs, ficam infectados e recrutam mais DCs. Foi mostrada que a expressão de CCL2 e CCL4 induzida por DENV em DCs está sob o controle de RIG-I E MDA5. Portanto, a interação com o RIG-I e MDA5 poderia impedir o recrutamento de células suscetíveis ao local da infecção (SPROKHOLT et al., 2017).

2.4.2 Resposta imune inata contra ZIKV

No local de inoculação, os vírions replicam-se em macrófagos de tecidos e células dendríticas, que transportam os vírus para os nódulos linfáticos de drenagem e outros tecidos linfóides. Nos tecidos linfóides, um grande número de macrófagos são recrutados e amplificam a replicação viral. Após um período de principalmente viremia associada a células, o vírus se espalha para outros monócitos, macrófagos ou células dendríticas em múltiplos tecidos. Vírions reunidos então se espalham para infectar os tecidos locais remanescentes.

Estudos em amostras clínicas humanas e modelos de culturas de células, primatas não humanos e camundongos sugerem que o ZIKV é pantrópico. Em amostras clínicas, a hibridização *in situ* identificou células progenitoras neurais, células gliais, células epiteliais amnióticas, células mesenquimais fetais (VAN DER EIJK AA, VAN GENDEREN PJ, VERDIJK RM, REUSKEN CB, 2016) e células Hofbauer (macrófagos da placenta) (BHATNAGAR et al., 2017; MINER; DIAMOND, 2017; ROSENBERG et al., 2017; SCHWARTZ, 2017) como permissivas. Estudos *ex vivo* e *in vitro* em células humanas também sugerem que o ZIKV replica-se em astrócitos (RETALLACK et al., 2016), trofoblastos (AAGAARD et al., 2017; TABATA et al., 2016), fibroblastos (placentários, uterinos, pulmonares) (CHEN et al., 2016), células endoteliais, várias células epiteliais e mononucleares do sangue periférico (HOU et al., 2017).

Em macacos rhesus, a hibridização *in situ* e a imunohistoquímica de NS2B demonstraram que neurônios, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são permissivos (HIRSCH et al., 2017; NGUYEN et al., 2017; OSUNA et al., 2016). Além disso, estudos independentes mostraram que o ZIKV pode persistir no sistema nervoso central e no tecido linfóide por mais de 4 semanas após a infecção (AID et al., 2017; HIRSCH et al., 2017). Descobertas similares em modelos de camundongos imunocompetentes e interferon-comprometidos sugerem pantropismo (BRAULT et al., 2016; LI et al., 2016). Refletindo o amplo tropismo do ZIKV, o RNA viral foi isolado de vários fluidos corporais humanos, incluindo saliva, urina, lágrimas, humor aquoso, leite materno, sêmen e lavagens vaginais (COLT et al., 2017; FURTADO et al., 2016; MOREIRA et al., 2017; TAN et al., 2017).

Um fator de entrada do vírus nas células do hospedeiro é o AXL, um membro da família TAM de receptores de tirosina quinases de superfície celular

(BHATTACHARYYA et al., 2013). O AXL foi sugerido atuar como um fator de entrada para ZIKV com base em estudos *in vitro* em células 293T, queratinócitos e células endoteliais e também por uma correlação com sua expressão em células progenitoras neurais alvo (HAMEL et al., 2015; RETALLACK et al., 2016; SAVIDIS et al., 2016a). Um estudo recente em células humanas revelou que a nocaute gênico de AXL não teve efeito sobre a entrada, replicação ou morte celular das células derivadas de células-tronco induzidas (iPSC) ou organoides cerebrais (WELLS et al., 2016).

Assim, embora alguns estudos sugerem que a AXL pode funcionar na cultura de células como um importante fator de entrada de ZIKV, múltiplos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a AXL não é necessária para a infecção de muitos tecidos. Outro receptor candidato para ZIKV é TIM1, uma glicoproteína que interage com fosfatidilserina exibida na membrana viral. Na verdade, o TIM1 é expresso amplamente em vários tipos de células infectadas com ZIKV (por exemplo, macrófagos Hofbauer, células endoteliais e citotrofoblastos) na placenta humana (TABATA et al., 2016). Uma vez confirmado como fisiologicamente relevante, os acessos essenciais de inserção ou entrada podem servir como alvos terapêuticos para bloquear a infecção por ZIKV e patogênese (MINER; DIAMOND, 2017).

A ativação da resposta imune inata efetiva contra o ZIKV segue o mesmo padrão do reconhecimento de PAMPs de DENV e é dependente da sinalização de IFN-I para iniciar a cascata de eventos para a liberação desta citocina a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados ao vírus por diferentes receptores de reconhecimento de padrões (UEMATSU; AKIRA, 2008).

Durante a infecção pelo ZIKV, se observa a regulação positiva de TLR3, mas não de TLR7, em fibroblastos humanos (HAMEL et al., 2015). Outro estudo demonstrou que o ZIKV reduz o crescimento de organoides cerebrais de células-tronco embrionárias humanas, visando progenitores neurais. Além disso, o ZIKV mostrou ativar a resposta imune inata mediada por TLR3, levando à desregulação de uma rede de 41 genes envolvidos na neurogênese, orientação de axônios, apoptose e diferenciação (DANG et al., 2016).

Como os camundongos nocautes para Stat2 podem sucumbir à infecção pelo ZIKV (PERRY et al., 2011), mas não pelo DENV (ASHOUR et al., 2010; PERRY et al., 2011), a sinalização direcionada por STAT2 pode desempenhar um papel mais importante contra o ZIKV do que o DENV. As atividades combinadas de IRF-3, -5 e -7 são mais importantes que o IFNAR na restrição da infecção sistêmica pelo ZIKV em

camundongos (LAZEAR et al., 2016), e o IRF-3 e -7 são mais importantes que o IFNAR na limitação da infecção pelo ZIKV no trato reprodutivo feminino murino (YOCKEY et al., 2016) Interferons do tipo III têm um papel na proteção contra a infecção pelo ZIKV em sincitiotrofoblastos humanos de placenta a termo (BAYER et al., 2016).

Estudos recentes indicaram que vários ISG, como IFITM1 e IFITM3, podem inibir a replicação de ZIKV (SAVIDIS et al., 2016b), as ligases de E3 induzíveis ao IFN podem estar envolvidas neste processo. Muitas ligases de E3, tais como membros da família TRIM, incluindo TRIM5a, TRIM23, TRIM25 e TRIM31, podem ser reguladas positivamente pelo IFN através de STAT1 (CARTHAGENA et al., 2009; VERSTEEG et al., 2014).

2.5 Moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 da imunidade inata

As moléculas CD80 e CD86 em mamíferos são proteínas transmembrana tipo I (TM), ambas consistindo de cinco domínios distintos: um peptídeo sinal, um domínio variável de imunoglobulina (IgV), um domínio semelhante a constante de imunoglobulina (IgC), um domínio de TM, e um domínio citoplasmático (BHATIA et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Nos mamíferos, a ativação ótima das células T requer dois sinais. O primeiro sinal é realizado pela interação do receptor de células T (TCR) com o complexo peptídeo-MHC apresentado na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). O segundo sinal é fornecido pela ligação dos receptores CD28 e CD152 nas células T com seus ligantes co-estimulatórios nas APCs (BROMLEY et al., 2001; MERWE; DAVIS, 2003). Os dois ligantes co-estimulatórios mais importantes são o CD80 (também denominado B7-1) e o CD86 (também denominado B7-2), ambos pertencentes à superfamília B7. A ligação de CD28 com CD80 ou CD86 aumenta a ativação de células T, enquanto a ligação de CD152 com CD80 ou CD86 atenua a resposta de células T (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; HUANG, 2012).

Como o CD80 e o CD86 são as principais moléculas co-estimulatórias no fornecimento de sinais de ativação para as células T, a maioria dos estudos funcionais neles se baseiam em suas formas ligadas à membrana (BHATIA et al., 2006). Em mamíferos, o CD86 é expresso constitutivamente em um nível baixo e pode ser rapidamente regulado positivamente por vários estímulos, incluindo o LPS, enquanto

a expressão do CD80 só é induzível posteriormente após a ativação do CD86 (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; HATHCOCK, 1994; SHARPE; FREEMAN, 2002). Em mamíferos, CD80 e CD86 são expressos por APCs, incluindo células dendríticas, macrófagos / monócitos e células B (COLLINS; LING; CARRENO, 2005). Outros estudos revelaram que as propriedades bioquímicas e de sinalização de CD80 e CD86 são diferentes: a afinidade de ligação de CD80 a CD28 e CD152 é significativamente maior que a de CD86; o CD86 tende a ligar-se ao CD28 para ativar as células T, enquanto o CD80 tende a se ligar ao CD152 para atenuar a resposta excessiva das células T, o CD86 aumenta as respostas das células T helper (Th), enquanto o CD80 favorece a diferenciação das células Th1 (BHATIA et al., 2005, 2006; SANSOM, 2000).

O CD28 / CD80 é um par de moléculas co-estimulatórias que medeiam e melhoram as respostas imunes, mas essas moléculas não estavam diretamente envolvidas nas respostas imunes da memória (KOPF et al., 2000). O sinal CD28 / CD80 ativa as células T para expressar várias outras moléculas co-estimulatórias, essas moléculas co-estimulatórias controlam o equilíbrio da resposta imune e a estabilidade do ambiente interno. O CTLA-4 (CD152) é homólogo ao CD28 e também expresso em células T ativadas, mas o domínio citoplasmático de CTLA-4 possui um motivo inibidor baseado em tirosina imunorreceptor (ITIM) (TOPALIAN et al., 2016). Portanto, o CTLA-4 se liga ao CD80 em competição com CD28 com uma afinidade 20 vezes maior que o CD28 / CD80 e pode enviar um sinal inibitório para as células T ativadas através do seu motivo ITIM para restaurar o equilíbrio da resposta imune (PENTCHEVA-HOANG et al., 2004; VOGEL et al., 2015).

O CTLA-4 ativa a proteína tirosina fosfatase (PTP) através da estrutura do ITIM e inibe a transdução do sinal de ativação das células T, levando a uma regulação negativa da ativação das células T (CHEMNITZ et al., 2004). Além disso, o CTLA-4 inibe a expressão da cadeia alfa do receptor IL-2, a secreção de IL-2 e o acúmulo de mRNA IL-2, resultando também em uma inibição da ativação de células T em modelos de camundongos pré-clínicos (HANNANI et al., 2015). Assim, sinais co-estimulatórios mediados por moléculas co-estimulatórias, incluindo sinais positivos e sinais negativos, desempenham papel importante na regulação da interação entre células T e DCs e na manutenção do equilíbrio da resposta imune.

2.6 miRNA no contexto de regulação da resposta imune pelos vírus

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes (ncRNAs) de ~ 22 nucleotídeos que medeiam o silenciamento gênico através da orientação de proteínas Argonaute (AGO) para locais-alvo na região não traduzida 3' (UTR) de mRNAs. As AGOs constituem uma grande família de proteínas que utiliza pequenos ácidos nucleicos de cadeia simples como guias para sequências complementares em RNA ou DNA direcionados para o silenciamento (SWARTS et al., 2014). A AGO carregada com miRNA forma um módulo de direcionamento do complexo silenciador induzido por miRNA (miRISC), que promove a repressão da tradução e a degradação de mRNAs direcionados (BERNSTEIN et al., 2003). Os miRNAs estão envolvidos em praticamente todos os processos celulares e são essenciais para o desenvolvimento animal, diferenciação celular e homeostase; a deleção dos fatores fundamentais da biogênese do miRNA Dicer (BERNSTEIN et al., 2003) e Drosha (CHONG et al., 2010) são letais em embriões de camundongos.

Os genes de miRNA são transcritos em miRNA primários (pri-miRNA) e passam por biogêneses de várias etapas, nas quais são processados primeiro em pré-miRNAs e finalmente em miRNAs maduros. Os miRNAs exibem padrões de expressão específicos de tecidos (LANDGRAF et al., 2007), que são principalmente regulados transcricionalmente (HA; KIM, 2014). São transcritos principalmente pela RNA polimerase II (BRACHT et al., 2004; CAI; HAGEDORN; CULLEN, 2004; LEE et al., 2004) e podem ser derivados de íntrons ou de RNAs longos não codificantes (lncRNAs). Os Pri-miRNAs, com estrutura espacial secundária caracterizada por uma alça em forma de grampo (*stem loop*) contendo cap 5' e cauda poli (A) 3'. Algumas exceções são os miRNAs transcritos pela RNA polimerase III (BUSHATI; COHEN, 2007) podem consistir de um único miRNA maduro ou de clusters de miRNAs frequentemente relacionados (BEREZIKOV, 2011; LAU et al., 2001). Os miRNAs são agrupados em famílias (LIM et al., 2003) com base na semelhança de suas sequências de sementes; a semente compreende os nucleotídeos 2-8 e é primariamente responsável pelo direcionamento de miRNAs que se ligam nos mRNAs (BARTEL, 2009).

Os locais alvo de miRNA estão geralmente localizados no 3' UTR (região 3' não traduzida) dos mRNAs; eles possuem forte complementaridade com a região de sementes (BARTEL, 2009), o qual é o principal critério para predição de sítios-

alvo (AGARWAL et al., 2015; BETEL et al., 2010; WONG; WANG, 2015). Os sítios-alvo canônicos mais fortes são os que complementam os nucleotídeos 2-8, 2-7 ou 3-8 do miRNA (AGARWAL et al., 2015).

A ligação cruzada de mRNA AGO-alvo permite a identificação de sítios de ligação não-canônicos (GROSSWENDT et al., 2015; HELWAK et al., 2013). Além da semente, o restante do miRNA também pode contribuir para o reconhecimento do alvo (particularmente os nucleotídeos 13–16, que são denominados de “região suplementar”) em um subconjunto de sítios (AGARWAL et al., 2015; GRIMSON et al., 2013). A ligação AGO-miRNA à 3' UTR leva ao silenciamento do gene através da repressão da tradução e do decaimento do mRNA (GUO et al., 2011; JONAS; IZAURRALDE, 2015). Um miRNA pode silenciar centenas de genes, embora o efeito em cada gene seja geralmente leve (SELBACH et al., 2008), e múltiplos miRNAs possam regular o mesmo gene (UHLMANN et al., 2012). Além disso, vias celulares inteiras podem ser reguladas por miRNAs individuais ou clusters de miRNA (MESTDAGH et al., 2011).

Os vírus evoluíram para reutilizar ou modular os miRNAs dos hospedeiros para sua replicação, o que frequentemente afeta a função do miRNA. A interação mais bem estudada é entre o HCV e o miR-122. O HCV é um vírus RNA de cadeia simples de sentido positivo da família *Flaviviridae*, causador de infecção hepática aguda e crônica (WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2015). Sua região 5' UTR altamente estruturada contém um local de entrada dentro do ribossômico (OTTO; PUGLISI, 2004) e, assim, no extremo 5' do RNA genômico, dois locais de ligação para o miR-122 (JOPLING; SCHÜTZ; SARNOW, 2008). Os locais de ligação recrutam Ago2 – miR-122 para a extremidade 5' UTR não delimitada do RNA viral para protegê-lo da resposta antiviral celular e atividade de exonuclease (AMADOR-CAÑIZARES et al., 2018; SEDANO; SARNOW, 2014). Este funcionalmente sequestra o miR-122 citoplasmático, que é um miRNA supressor de tumor responsável pela manutenção hepática e potencialmente explica a ligação entre a infecção crônica pelo HCV e um risco aumentado de desenvolver carcinoma hepatocelular (LUNA et al., 2016).

Outro vírus da família *Flaviviridae* que se liga aos miRNAs hospedeiros é o vírus da diarreia viral bovina, que é um vírus bovino economicamente importante. A ligação de let-7 e miR-17 a uma região estruturada do RNA viral 3' UTR promove a replicação viral. O miR-17 também estabiliza o RNA viral ao se ligar e aumenta sua tradução através de um mecanismo desconhecido. A ligação do miR-17 ao RNA viral libera

alvos celulares do miRNA, efeito também observado com o vírus da peste suína clássica (SCHEEL et al., 2017). A detecção de interações similares entre miRNAs e RNA genômico viral de diferentes membros da família Flaviviridae, assim como aqueles miRNAs reguladores de transcritos da sinalização da resposta imune, levanta a questão sobre se esse mecanismo pode ser ainda mais difundido nesta família, o que inclui outros membros relevantes para a saúde, como o vírus da Dengue e o Zika vírus (GEBERT; MACRAE, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

Por muitos anos os arbovírus causam uma preocupação crescente para os serviços públicos de saúde de todo o mundo. As Américas estão entre os lugares de fácil e rápido proliferação do mosquito capaz de ser carreador de arbovírus pelo seu clima tropical. A dengue assola o Brasil há muitos anos e em 2015 o ZIKV causou surtos de microcefalia e outras manifestações clínicas, a maior epidemia já registrada no mundo.

Um aspecto que chama atenção é que o Brasil tem a possibilidade de um cenário epidemiológico único, cujos vírus podem ser encontrados em vários estados brasileiros. Com o passar do tempo várias epidemias acometeram o Brasil causados por arbovírus, recorrentes nas últimas décadas. Em 2016 já foi constatado a co-circulação do DENV e ZIKV, sendo assim possível que uma pessoa possa ser infectada pelo DENV e ZIKV. Dessa forma, o presente estudo tem por finalidade uma melhor compreensão da resposta imune inata frente à infecção pelo ZIKV em células previamente infectadas pelo DENV. Este projeto pretende identificar parâmetros imunológicos inatos para uma melhor compreensão dos eventos associados ao desenvolvimento das patologias relacionadas à infecção pelo ZIKV em indivíduos previamente infectados pelo DENV.

4 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar resposta imune inata após infecção pelo *Zika virus* em macrófagos previamente infectados com *Dengue virus*

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Diferenciar células da medula óssea em macrófagos (BMDM).
- b) Infectar com ZIKV as BMDM, previamente infectadas com DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4.
- c) Avaliar a expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 no modelo de infecção proposto.
- d) Avaliar a expressão diferencial de genes codificadores de citocinas da imunidade inata: *IL-1 β* ; *TNF- α* ; *IFN- β* .
- e) Avaliar a viabilidade celular das BMDMs após infecção.
- f) Analisar os miRNAs potencialmente envolvidos no controle da expressão de *IL-1 β* e *TNF- α* .

5 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico será descrito a metodologia no desenvolvimento deste trabalho.

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com seis a oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Esses animais foram mantidos no Biotério setorial D101 sob condições controladas de temperatura, limpeza e com acesso livre à água e ração. Os protocolos do experimento foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL-MG, sob registro 70-2017 (Anexo 1)

5.2 AMOSTRAS UTILIZADAS DE DENV E DO ZIKV

A amostra de DENV que foi utilizada neste trabalho faz parte da coleção de vírus do Laboratório de Vacinas da UNIFAL-MG e foi isolada de um paciente sintomático no sul de Minas Gerais (Alfenas) pela equipe do referido laboratório. A amostra de ZIKV que foi utilizada neste trabalho foi isolada de um paciente sintomático do Ceará e gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

5.2.1. Produção e titulação de DENV

Células C6/36 mantidas em meio L-15 a 0% de SFB em monocamada foram infectadas com DENV em um MOI de 0.01. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente foi adicionado às células infectadas meio de cultura L-15 a 1% de SFB. Após 7 dias ou até ser possível a observação de formação de sincícios, o sobrenadante das células foi coletado, centrifugado para a eliminação de debris celulares e filtrado em malha de 2 μ M. O sobrenadante livre de contaminantes foi congelado à -80°C até a sua titulação.

Para titulação do DENV foram utilizadas células BHK-21. Uma suspensão de células e do sobrenadante proveniente da produção do DENV será utilizado para plaqueamento de 4x10⁵ células por poço em uma placa de 24 poços. As células foram

incubadas a 37°C/5% de CO₂ por aproximadamente 16 horas. A viabilidade das células foi avaliada durante 7 dias e foi determinado o título viral.

5.2.2 Produção e titulação do ZIKV

Afim de se obter a titulação do ZIKV foram preparadas e plaqueadas células Vero em uma densidade de 6×10^5 células/poço em placas de seis poços, adicionando-se um volume final para 2 mL com meio DMEM 5% de SFB. A placa contendo as células foi incubada a 37°C/5% de CO₂, até atingir a confluência de 90%. Nesse momento uma alíquota do ZIKV foi descongelada e diluída em meio DMEM sem adição de SFB numa proporção de 1:10. Diluições seriadas da alíquota viral até a diluição de 10^{-5} foram feitas. Sobre as células em monocamada foi adicionado 400 uL/poço das diluições. Após 5 dias a 37°C/5% de CO₂, as células foram fixadas com formaldeído a 10% por aproximadamente 16 horas. Foi corado com Cristal Violeta por 60 min, por final foi contado as PFU da diluição com o nº de PFUs entre 30 e 300.

5.3 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 foram sacrificados por dose letal de anestésico e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades desses ossos foram cortadas e foi injetado aproximadamente 5 mL de solução salina estéril por osso. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos e o precipitado de células foi ressuscitado em 1 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 ul de Penicilina/Streptomicina e 125 uL de Anfotericina B.

As amostras foram submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 µm para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Após a filtração, as células foram plaqueadas em Placas de Petri e incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, de maneira a obter somente células que ainda não se diferenciaram. Para isso, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e posteriormente ressuscitadas em 1 mL de DMEM suplementado. As células viáveis foram contadas por meio da coloração com o corante Azul de Tripán na câmara de Neubauer. Para a obtenção de Macrófagos Derivados da Medula Óssea (BMDMs) as células viáveis foram distribuídas em placas

de 24 poços com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 ul de Penicilina/Streptomicina, 125 uL de Anfotericina B e 10% de LCCM, (L929 *cell conditioned medium*) como uma fonte de fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF) na concentração de 5×10^5 células por poço. A placa foi incubada a 37°C e sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para a diferenciação em macrófagos, três dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 100 uL de M-CSF por poço e no sétimo dia, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo também M-CSF. No décimo dia a célula foi analisada quanto sua morfologia, expressão do marcador CD11b e foi realizada a infecção dos BMDMs.

5.4 INFECÇÃO DE BMDMs COM ZIKV, PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV

Após a diferenciação das células em BMDMs e a confirmação da expressão de marcadores de superfície específicos, CD11b⁺, as células foram infectadas com DENV (MOI: 1:1) por 12 horas. Após este período as células foram infectadas com ZIKV (MOI: 0.1:1). Após 12 horas as células foram coletadas para análise dos marcadores de superfície (citometria de fluxo) e o sobrenadante das células foi coletado ou foi adicionado sobre a monocamada celular LS Trizol® (Life Technologies, USA) para extração de RNA total.

5.5 ANÁLISE DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CD80, CD86 e CD11b POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise da expressão da ativação dos 1×10^6 BMDMs foram retirados das placas de cultura de células utilizando um raspador de células, *Cell scraper* (SPL Life sciences), devido à alta aderência dos BMDMs, mantidas em suspensão onde receberam o anticorpo anti- CD16/CD32 para o bloqueio de ligações inespecíficas da porção Fc do anticorpo. Após a incubação de 40 minutos à 4°C foram adicionados anticorpos específicos para as moléculas CD80 e CD86 marcados com FITC (BD Biosciences) juntamente com o marcador de superfície CD11b utilizando anticorpo monoclonal CD11b PE (BD Biosciences). Após 30 minutos de incubação à 4°C as células foram lavadas com 2mL de solução salina tamponada (PBS) e foram levadas

a leitura no citometro de fluxo da Guava® easyCyte Flow Cytometers – Merck. Dez mil eventos foram coletados e comparados com células não infectadas. Células não marcadas foram utilizadas como controle para a determinação dos *gates*.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES CODIFICADORES DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL

Procedimentos realizados para extração, síntese de cDNA e PCR em tempo real.

5.6.1 Extração de RNA total

Para análise da expressão diferencial dos genes, o RNA das amostras provenientes das culturas celulares infectadas ou estimulados com PBS, foi extraído utilizando o reagente LS Trizol® (Life Technologies, USA) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado em Nanodrop (ThermoScientific, USA) a 260 nm e armazenado a -80°C até ser utilizado para a síntese do cDNA de fita simples.

5.6.2 Reação de Transcrição Reversa para síntese de cDNA

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit ilustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Helathcare), onde 1µg de cada amostra foi utilizado. Foi utilizado oligo-dT como oligonucleotídeo iniciador para a síntese da primeira fita dos mRNAs contidos nas amostras. Após a conclusão da reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C para posteriores análises de PCR em tempo real.

5.6.3 PCR em tempo real para análise de genes codificadores de citocinas

Para análise da expressão diferencial dos genes codificadores das IL- 1β; TNF-α; IFN- β, os iniciadores foram desenhados utilizando dados da literatura ou através do software RTPimerDB. Os iniciadores utilizados e suas sequências estão representados na tabela 1. As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI

7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume final das reações foi de 10 uL contendo 5 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM de cada oligonucleotídeo e 3 uL do cDNA de cada amostra. As condições de amplificação utilizadas para a análise de genes codificadores de citocinas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. As reações que compreendem a faixa de 95%-105% de eficiência foram utilizadas e aceitas para as análises posteriores.

Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi a β -actina. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

Primer	Sequência
IL-1 β - F	5' - TGACCTGGGCTGTCCAGATG -3'
IL-1 β - R	5'- CTGTCCATTGAGGTGGAGAG-3'
TNF- α F	5'- CATCTTCTCAAATTCGAGTGACA-3'
TNF- α R	5'- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
IFN- β F	5'- CCGAGCAGAGATCTTCAGGAA – 3'
IFN- β R	5' – CCTGCAACCACCACTCATTCT – 3'
β – actina F	5'- AGGTGTGCACTTTTTATTGGTCTCAA -3'
β – actina R	5' TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT -3'

Fonte: Do autor

5.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio colorimétrico com brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após 24 horas de infecção com os vírus, à placa de 24 poços foi adicionado o MTT na concentração de 5 mg/ml por poço e incubada à 37°C (5% de CO₂) por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e foi adicionado o tampão de extração de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A solução resultante foi homogeneizada a fim de garantir a completa dissolução do corante. Para quantificação, cada amostra/poço foi transferida para uma placa de 96 poços e foi feita a leitura em um comprimento de onda de 550 nm utilizando um espectrofotômetro para placa ELISA Anthos Zenyth 200rt.

5.8 ANÁLISE DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CD86 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Em uma placa de 24 poços, nas quais foram previamente adicionadas lamínulas redondas estéreis, foram cultivados 1×10^6 BMDMs. Após período de cultivo adequado, as placas foram incubadas à 4°C por 40 minutos com anticorpo anti-CD16/CD32 a fim de garantir o bloqueio de ligações inespecíficas da porção Fc do anticorpo. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais anti-CD86, marcado com FITC (BD Biosciences), e o anticorpo anti-CD11b, marcado com PE (BD Biosciences). A placa foi incubada em câmara escura “overnight” à 4°C. Após uma lavagem com 2mL de solução salina tamponada (PBS), foi adicionado às células o marcador nuclear DAPI na diluição 1:4000 (1µL para 4000 µL de PBS), incubando-as por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, as lamínulas depositadas nos poços da placa foram vertidas em uma lâmina com glicerol e seladas adequadamente. As lâminas resultantes foram lidas em um Microscópio de Fluorescência Nikon Eclipse 80i. As imagens foram obtidas pelo *software* NIS-Elements BR 3.1 e analisadas pelo programa ImageJ.

5.9 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DE miRNAs CAPAZES DE INTERAGIR COM *TNF- α* e *IL-1 β*

A fim de verificar quais miRNA interagem com os genes pró-inflamatórios *TNF- α* e *IL-1 β* foram utilizados os softwares: TargentScan 7.2, miRDB (2016) e miRWalk 3.0. Nos softwares foram utilizados os dados encontrados para um score de 0,90. Todos os miRNA encontrados foram colocados em uma planilha de Excel, onde foi possível por meio de uma função encontrar quais eram os miRNA que interagem com ambos os genes.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D’agostino Pearson. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância unifatorial (One-way ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparações

múltiplas. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad Prism 6 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

6 RESULTADOS

Os resultados apresentados referem-se aos ensaios imunológicos e moleculares realizados.

6.1 MAIS DE 98% DAS CÉLULAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA FORAM MARCADAS COM ANTI-CD11b⁺

Para as análises de infecção com o DENV e/ou ZIKV, células da medula óssea de animais C57BL/6 foram obtidas de tíbias e fêmures, tratadas com o fator de diferenciação para macrófagos M-CSF, e 10 dias após o tratamento, as células foram avaliadas quanto à expressão da molécula CD11b em suas membranas. Para isso foi avaliado por citometria de fluxo a porcentagem de células positivas para este marcador de macrófagos tanto em células que receberam o fator de diferenciação quanto daquelas que não passaram pelo processo de diferenciação.

Verificado pelo *dot-plot* da citometria de fluxo quando comparado às células não diferenciadas (Figura 5A) uma média de 98% de células que sofreram o processo de diferenciação (Figura 5B) apresentaram positividade para CD11b e foram consideradas como BMDM (Figura 5C).

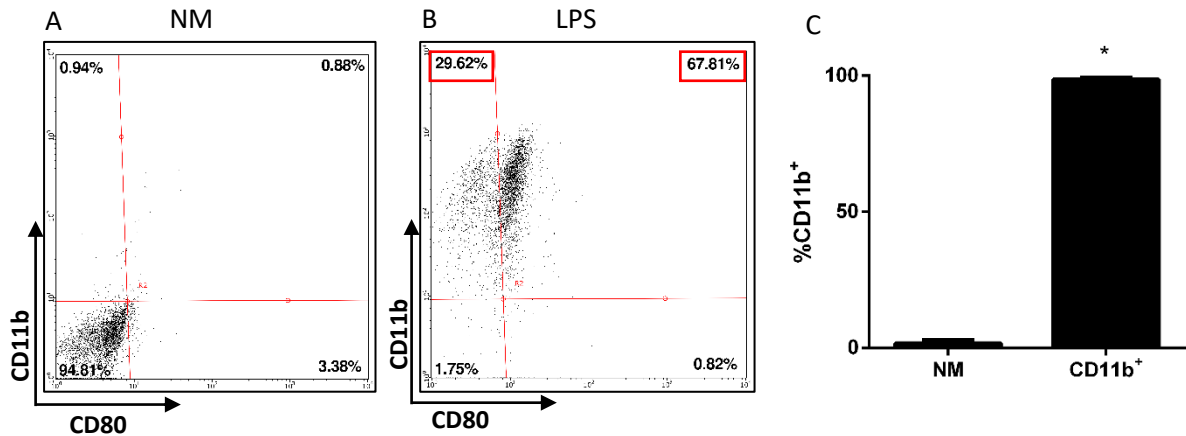


Figura 5- Mais de 98% das células derivadas da medula óssea foram marcadas com ANTI-CD11b+. Estratégia de análise de expressão de CD11b em macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL/6. A definição dos gates foi baseada na análise de células que não passaram por diferenciação. **A:** Dot-plot da detecção de fluorescência de duas moléculas de membrana celular (CD11b ou CD80) em células que não passaram pelo processo de diferenciação. **B:** Dot-plot da detecção de fluorescência de duas moléculas de membrana celular (CD11b ou CD80) em células que passaram pelo processo de diferenciação. **C:** Porcentagem de células CD11b+ dos dois tratamentos, onde os dados estão expressos como média \pm DP. Teste t não paramétrico, seguido pelo teste de Mann-Whitney post-hoc. * $p < 0,05$ relacionado a NM.

Fonte: Do autor

6.2 Os BMDMs INFECTADOS COM ZIKV PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV APRESENTARAM VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CD80 DEPENDENTE DO SOROTIPO

Os BMDMs foram infectados com os diferentes sorotipos de DENV e doze horas após foram infectados pelo ZIKV para análise da expressão de CD80, um marcador de ativação de macrófagos, por citometria de fluxo. Utilizando-se dos valores de intensidade de fluorescência média (MFI) (Figura 6I) gerados pelo software Guava® InCyte, os dot-plots de cada grupo (Figura 6A-H) foram analisadas quanto a expressão do CD80.

As moléculas co-estimulatórias expressas em BMDM são críticas para o desenvolvimento ideal de respostas imunes adaptativas. Após a exposição a um patógeno, as BMDM sofrem ativação, levando a um aumento nos níveis de moléculas co-estimulatórias. Dessa forma, foi possível observar que, quando macrófagos NI são infectados com ZIKV e previamente infectados com DENV1, há uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de CD80 (Figura 6I) ($p < 0,05$). No entanto, quando comparado ao grupo DENV4/ZIKV foi possível observar um aumento estatisticamente significativo da expressão de CD80 ($p < 0,05$).

Macrófagos infectados com DENV1/ZIKV apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de CD80, quando comparados ao grupo que apresentava apenas a infecção isolada com ZIKV ($p < 0,05$), resultado oposto ao observado para o grupo DENV4/ZIKV, que demonstrou um aumento estatisticamente significativo na expressão dessa mesma proteína quando comparado ao grupo ZIKV ($p < 0,05$).

Comparando-se os resultados obtidos para os sorotipos de DENV aos seus respectivos grupos que infectados posteriormente com ZIKV, foi possível observar que apenas o grupo DENV4/ZIKV demonstrou um aumento estatisticamente significativo na expressão de CD80 quando comparado ao grupo DENV4 ($p < 0,05$).

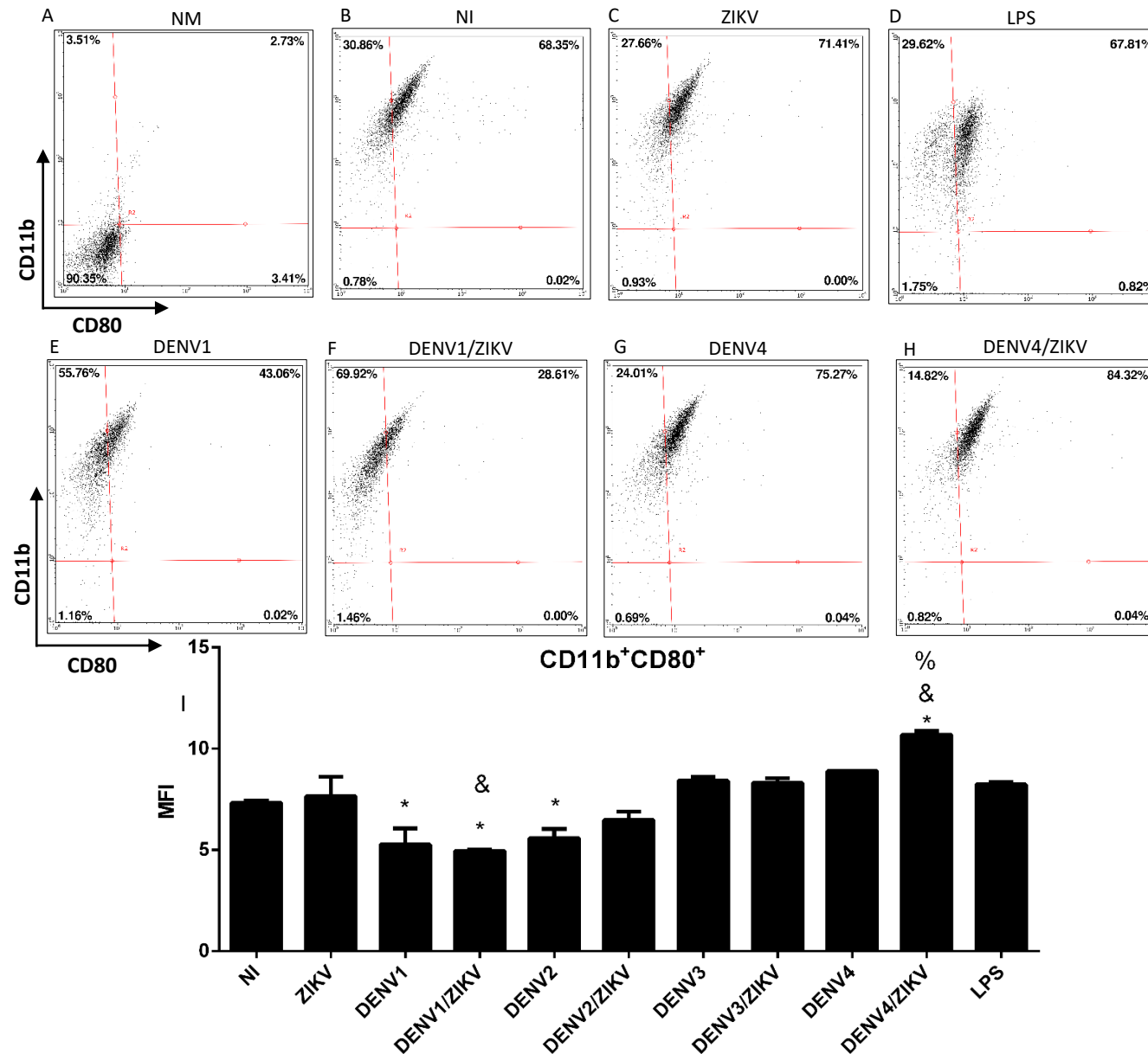


Figura 6 -Os BMDMs infectados com ZIKV previamente infectados com DENV apresentaram variação na expressão de CD80 dependente do sorotipo. Estratégia de análise de expressão de CD11b e CD80 em macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL/6. A definição dos gates foi baseada na análise de células que não passaram por diferenciação. **A-H**: Dot-plot da detecção de fluorescência de duas moléculas de membrana celular (CD11b ou CD80), para os grupos relevantes NI (A), NI (B), ZIKV (C), LPS (D), DENV1 (E), DENV1/ZIKV (F), DENV4 (G) e DENV4/ZIKV (H), **I**: MFI da expressão de CD11b⁺CD80⁺ em macrófagos infectados com ZIKV, previamente infectados com DENV1, DENV2, DENV3 ou DENV4. Dados expressos como média ± DP. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste Tukey post-hoc. * p<0,05 relacionado a NI. & p<0,05 relacionado a ZIKV. % p<0,05 relacionado a DENV4

Fonte: Do autor

6.3 OS BMDM INFECTADOS COM ZIKV PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV APRESENTARAM VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CD86 DEPENDENTE DO SOROTIPO

Após a infecção das BMDM com o ZIKV previamente infectadas com DENV, analisou-se a ativação dos macrófagos através do marcador CD86, outra molécula co-estimulatória que corresponde a ativação e maturação dos macrófagos. A análise da expressão de CD86 foi realizada por meio dos valores de intensidade de fluorescência média (MFI) (Figura 7I), dos Dot-Plot de cada grupo (Figura 7A-H) gerados pelo software Guava® InCyte e por microscopia de fluorescência (Figura 8).

Para os grupos DENV1; DENV2 e DENV1/ZIKV foi possível observar uma redução estatisticamente significativa na expressão de CD86 quando comparado ao grupo controle NI ($p < 0,05$). Ainda, os grupos DENV3/ZIKV, DENV4 e DENV4/ZIKV demonstraram um aumento estatisticamente significativo na expressão do marcador co-estimulatório quando comparado ao grupo controle NI ($p < 0,05$).

Para os grupos infectados com ZIKV após 12 horas da primeira infecção com DENV1 e DENV2, foi possível observar uma redução estatisticamente significativa na expressão de CD86 quando comparado ao grupo que apresentava apenas a infecção isolada com ZIKV ($p < 0,05$). No entanto, uma resposta contrária foi observada no grupo DENV4/ZIKV, em que foi possível observar um aumento estatisticamente significativo na expressão de CD86 quando comparado ao grupo ZIKV ($p < 0,05$).

Comparando os dados obtidos para os diferentes sorotipos de DENV aos seus respectivos grupos infectados posteriormente com ZIKV, foi possível observar novamente que, apenas o grupo DENV4/ZIKV demonstrou um aumento estatisticamente significativo na expressão de CD86 quando comparado ao grupo DENV4 ($p < 0,05$). A fim de confirmar os dados apresentados na citometria de fluxo para a expressão das moléculas co-estimulatórias, foi utilizada a microscopia de fluorescência cujos sorotipos foram avaliados segundo a expressão de CD86 nas BMDMs infectadas com ZIKV previamente infectadas com DENV2 ou DENV4. Os resultados apresentados na Figura 8 confirmam que as BMDMs expressam fortemente a molécula CD11b+ e que dependendo do sorotipo de DENV há aumento da expressão de CD86. Em células não infectadas, infectadas somente pelo ZIKV, pelo DENV2 ou DENV2/ZIKV é possível observar algumas marcações positivas para

CD86. Contudo, quando há infecção pelo DENV4 e mais proeminentemente quando há infecção pelo DENV4/ZIKV há grande quantidade de CD86 nas células CD11b+ em um padrão semelhante ao controle positivo LPS (Fig. 8).

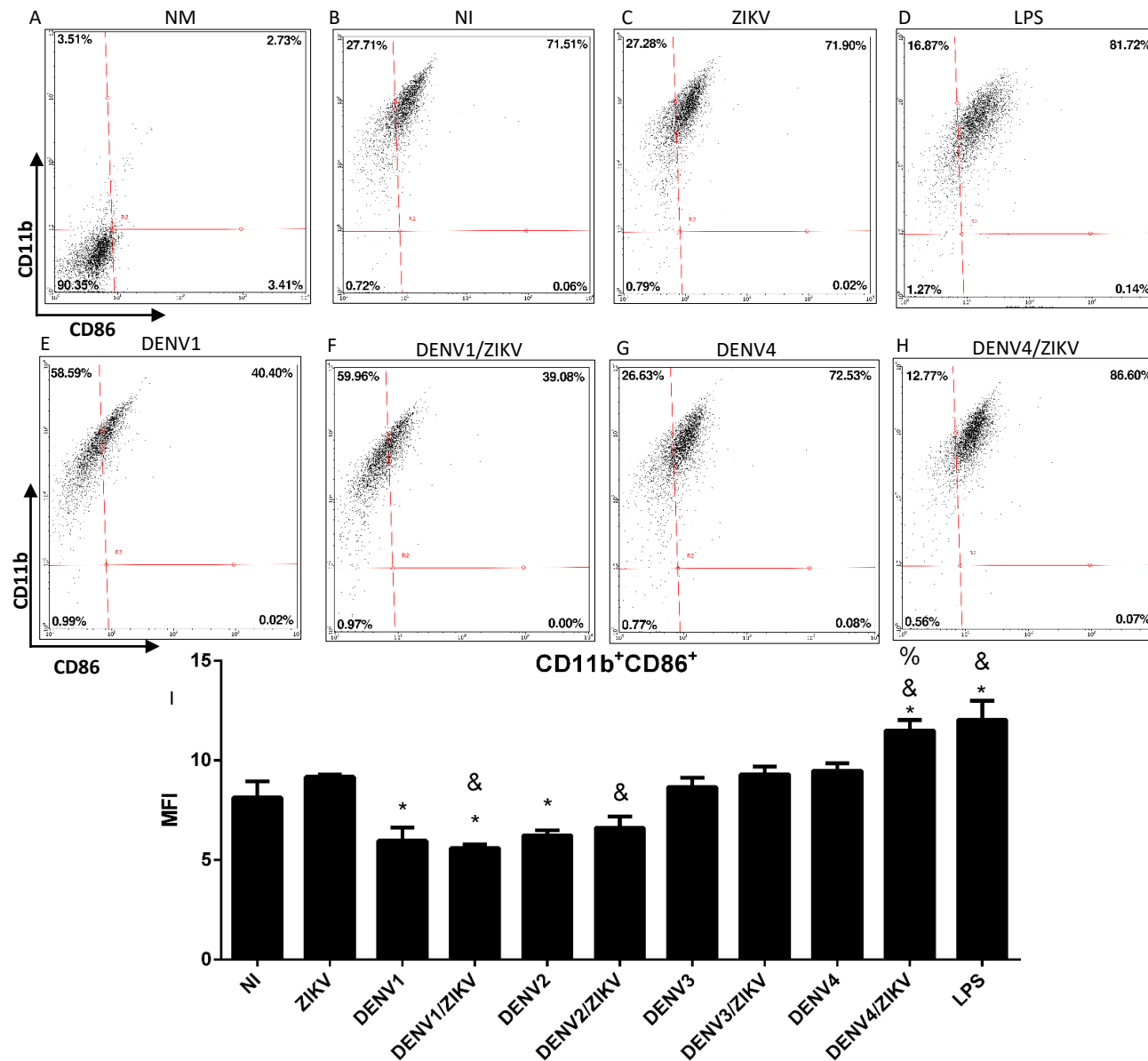


Figura 7 — Os BMDM infectados com ZIKV previamente infectados com DENV apresentaram variação na expressão de CD86 dependente do sorotipo. Estratégia de análise de expressão de CD11b e CD86 em macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL/6. A definição dos gates foi baseada na análise de células que não passaram por diferenciação A-H: Dot-plot da detecção de fluorescência de duas moléculas de membrana celular (CD11b ou CD86), para os grupos relevantes NM (A), NI (B), ZIKV (C), LPS (D), DENV1 (E), DENV1/ZIKV (F), DENV4 (G) e DENV4/ZIKV (H). I: MFI da expressão de CD11b⁺CD86⁺ em macrófagos infectados com ZIKV, previamente infectados com DENV1, DENV2, DENV3 ou DENV4. Dados expressos como média \pm DP. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste Tukey post-hoc. * p<0,05 relacionado a NI. & p<0,05 relacionado a ZIKV. % p<0,05 relacionado a DENV4.

Fonte: Do autor

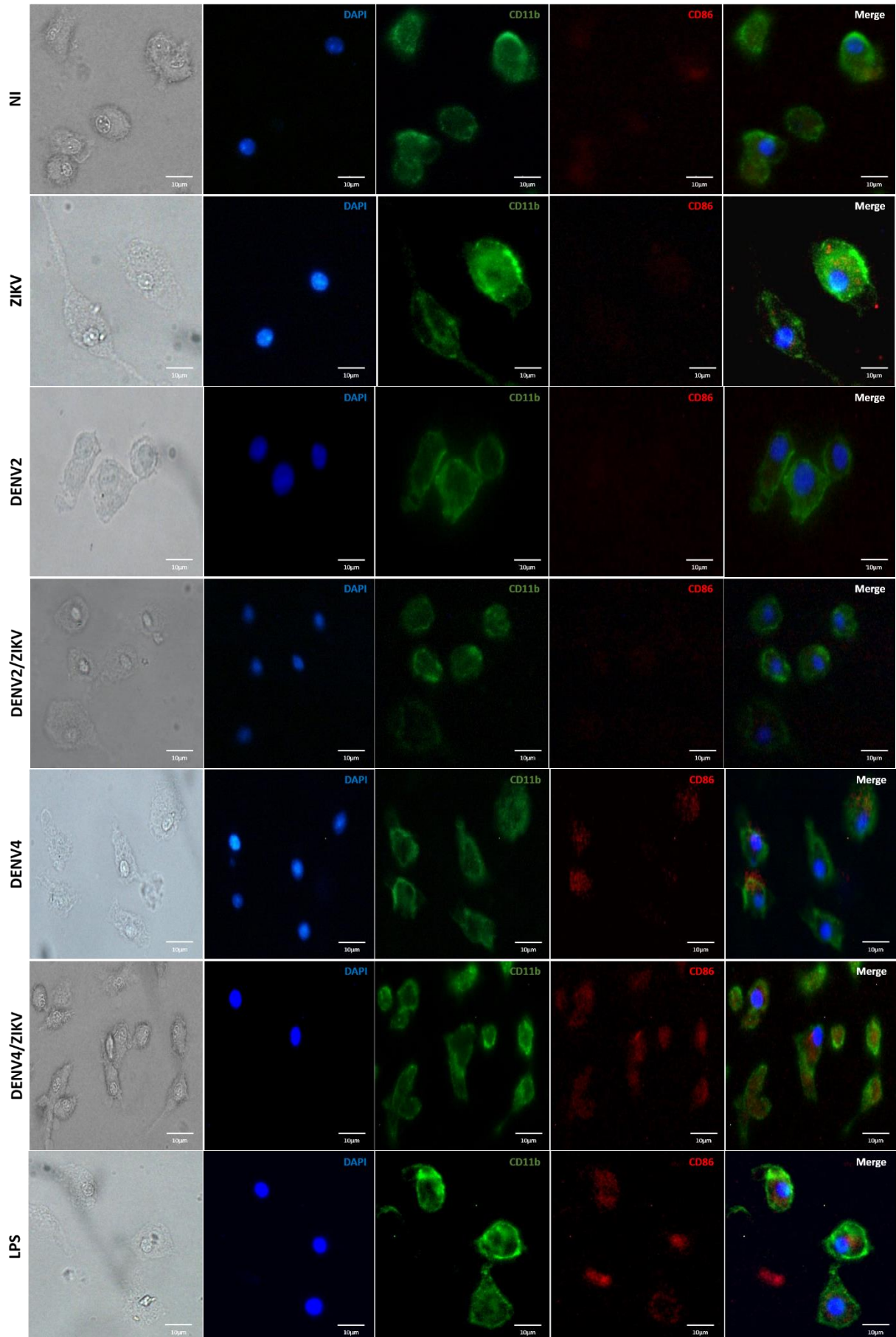


Figura 8 - Imunofluorescência após 24 horas de infecção pelo ZIKV em BMDM previamente infectados com DENV2 e DENV4. Estratégia de análise de expressão de CD11b e CD86 em macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL/6, revelando uma variação na expressão de CD86 dependente do sorotipo. Barra de escala = 10 μ m.

Fonte: Do autor

6.4 A EXPRESSÃO DE *IFN-β* É DIMINUÍDA EM TODOS OS GRUPOS DURANTE A INFECÇÃO DE ZIKV EM BMDM PREVIAMENTE INFECTADOS COM DENV, INDEPENDENTE DO SOROTIPO.

O IFN tipo I é uma das citocinas primárias que conferem uma resposta antiviral. Na figura 9 é possível observar que todos os grupos avaliados, tanto aqueles com infecções isoladas para os diferentes sorotipos de DENV quanto aqueles que apresentavam as duas infecções por DENV e ZIKV, demonstraram uma diminuição da expressão de *IFN-β* quando comparados ao grupo controle NI ($p < 0,05$).

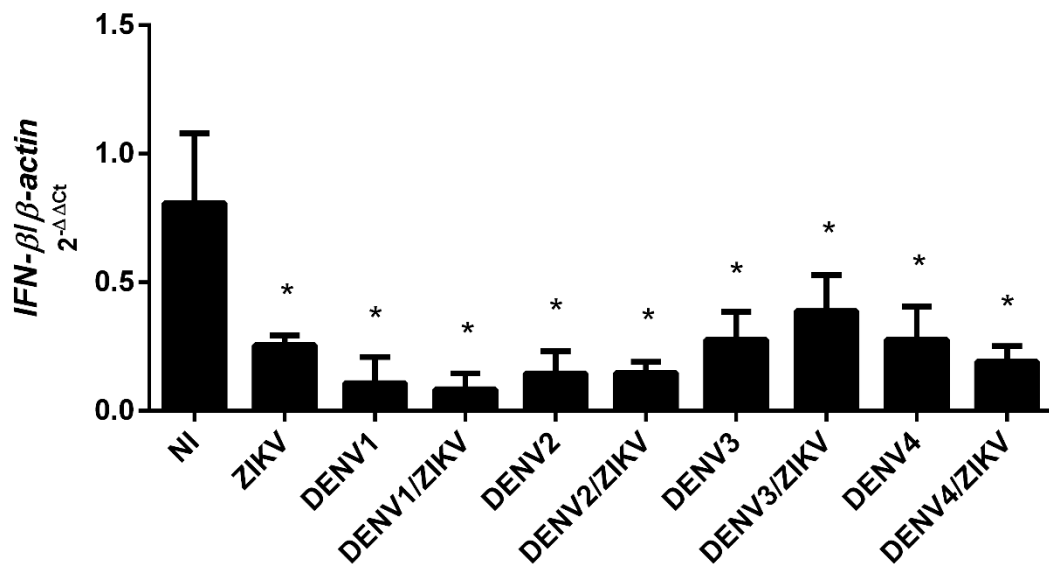


Figura 9 - A expressão de *IFN-β* é diminuída em todos os grupos durante a infecção de ZIKV em BMDM previamente infectados com DENV, independente do sorotipo. Quantificação diferencial do gene *IFN-β* em macrófagos infectados com ZIKV, previamente infectados com DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Dados expressos como média \pm DP. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste Tukey post-hoc. * $p < 0,05$ relacionado ao NI.

Fonte: Do autor

6.5 A INFECÇÃO COM ZIKV EM BMDM PREVIAMENTE INFECTADOS PELO DENV4 DIMINUEM A EXPRESSÃO DE *TNF- α* E *IL-1 β*

Utilizando-se das células infectadas com apenas DENV e aquelas que foram co-infectadas com ZIKV foi avaliado a expressão diferencial dos genes *TNF- α* e *IL-1 β* . A presença de um aumento na expressão de CD80 e CD86, devido às infecções, geralmente é acompanhado de um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios. Como demonstrado na figura 10A, as infecções com DENV1, DENV3, DENV3/ZIKV e DENV4 demonstraram um aumento estatisticamente significativo da expressão de *TNF- α* quando comparados ao grupo controle NI ($p < 0,05$). O grupo DENV3/ZIKV apresentou um aumento estatisticamente significativo na expressão dessa mesma citocina quando comparado ao grupo ZIKV ($p < 0,05$). Todavia, macrófagos infectados com DENV4/ZIKV apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de *TNF- α* (Fig. 10A) e *IL-1 β* (Fig. 10B) quando comparados aos macrófagos infectados apenas com DENV4 ($p < 0,05$).

Como demonstrado na Figura 10B, apenas o grupo DENV4 apresentou um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene pró-inflamatório *IL-1 β* ($p < 0,05$). Já os grupos ZIKV, DENV1, DENV1/ZIKV, DENV2/ZIKV e DENV3 apresentaram uma redução estatisticamente significativa na expressão dessa citocina quando comparados ao grupo controle NI ($p < 0,05$).

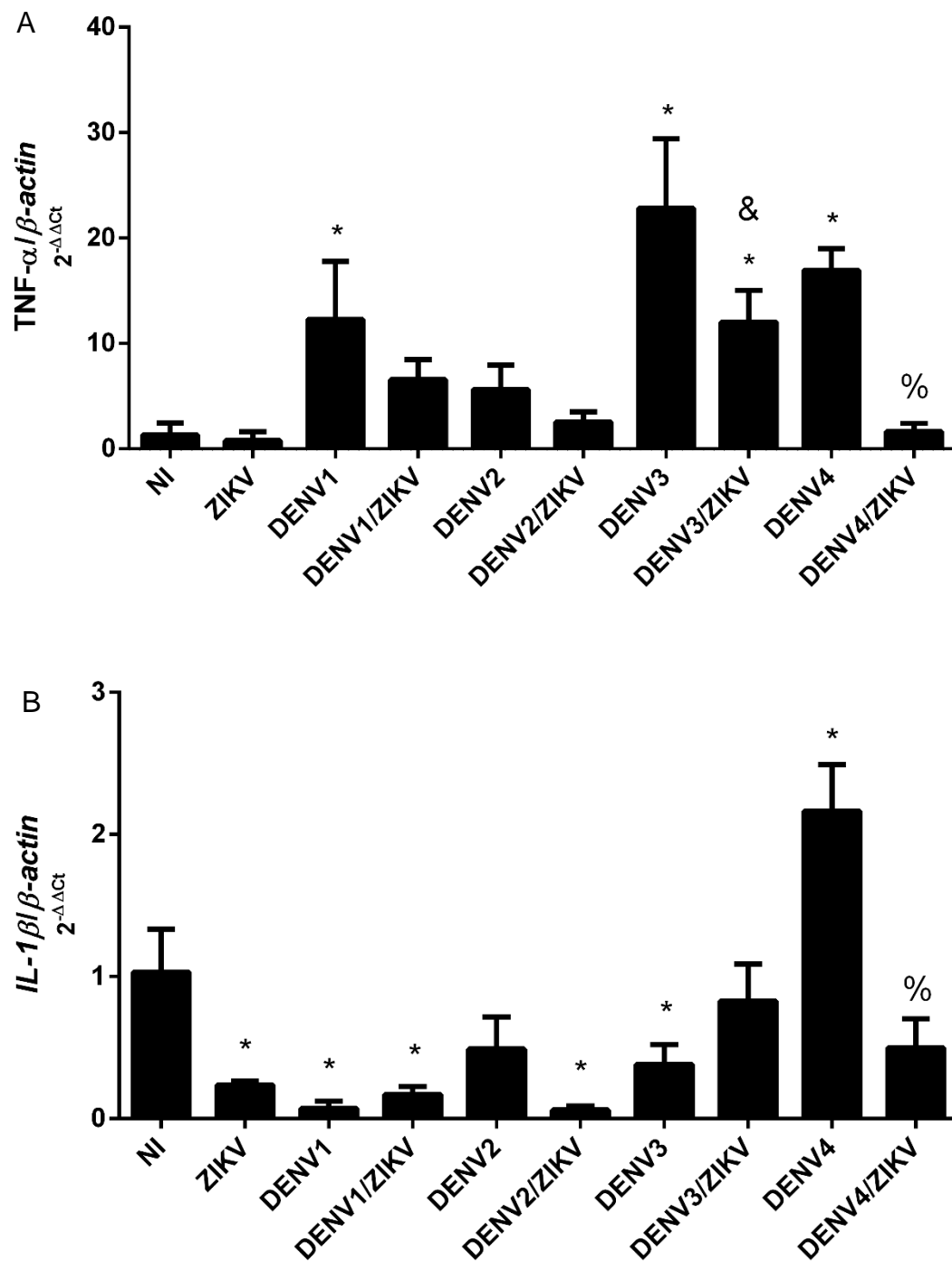


Figura 10 -A infecção com ZIKV em BMDM previamente infectados pelo DENV4 diminuem a expressão de *TNF- α* e *IL-1 β* . **A:** Quantificação diferencial do gene *TNF- α* em macrófagos infectados com ZIKV, previamente infectados com DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. **B:** Quantificação diferencial do gene *IL-1 β* em macrófagos infectados com ZIKV, previamente infectados com DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Dados expressos como média \pm DP. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste Tukey post-hoc. * $p < 0,05$ relacionado a NI. & $p < 0,05$ relacionado a ZIKV. % $p < 0,05$ relacionado a DENV4.

Fonte: Do autor

6.6 A INFECÇÃO COM ZIKV EM BMDM PREVIAMENTE INFECTADOS PELO DENV4 AUMENTARAM A PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.

Após a infecção com ZIKV, os BMDM previamente infectados com DENV2 e DENV4 foram submetidos ao ensaio de viabilidade celular. De uma forma geral, é possível observar que simultaneamente à redução da expressão dos genes pró-inflamatórios, há uma maior sobrevivência celular. Como demonstrado na Figura 11, as infecções com ZIKV, DENV2, DENV2/ZIKV, DENV4, LPS e Triton X demonstraram uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle NI ($p < 0,05$). No entanto, o grupo DENV4/ZIKV apresentou um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células viáveis quando comparado ao grupo ZIKV ($p < 0,05$) e ao grupo DENV4 ($p < 0,05$).

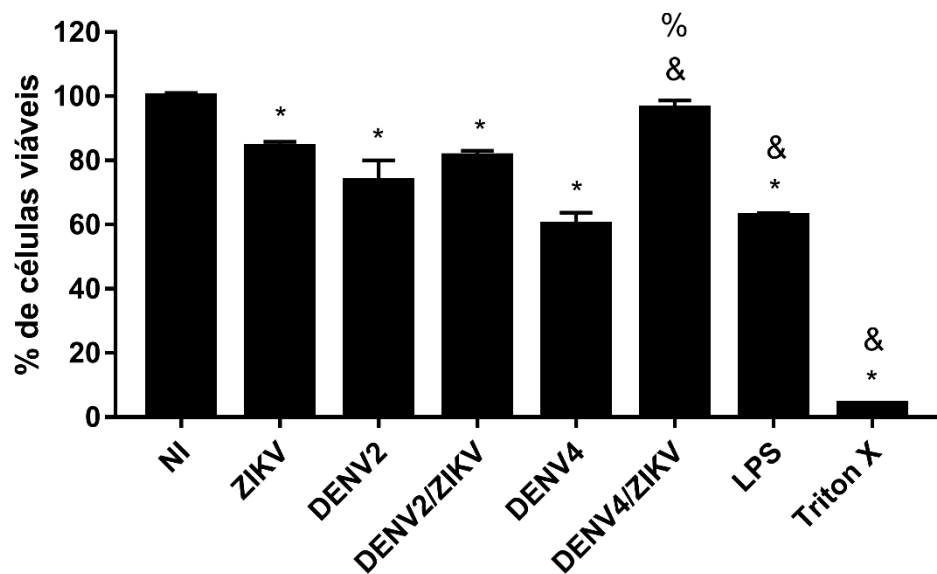


Figura 11 - A infecção com ZIKV em BMDM previamente infectados pelo DENV4 aumentaram a porcentagem de células viáveis. Quantificação de células viáveis infectadas com ZIKV, previamente infectados com DENV2, DENV4, LPS e Triton X. Dados expressos como média \pm DP. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste Tukey post-hoc. * $p < 0,05$ relacionado a NI. & $p < 0,05$ relacionado a ZIKV. % $p < 0,05$ relacionado a DENV4.

6.7 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA DEMONSTRARAM QUE 2799 miRNAS PODEM INTERAGIR COM OS GENES PRÓ-INFLAMATÓRIOS *TNF- α* e *IL-1 β*

Apesar da infecção pelo ZIKV acarretar no aumento da expressão de CD80 e CD86 em BMDM previamente infectados pelo sorotipo de DENV4, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa na expressão dos genes codificadores das citocinas pró-inflamatórias *TNF- α* e *IL-1 β* .

Dessa forma, a fim de compreender melhor como um processo infeccioso pode interferir nessas respostas mediadas por esses genes pró-inflamatórios, foram utilizadas análises de bioinformática para acessar possíveis miRNAs capazes de influenciar a expressão desses genes.

De acordo com a Tabela 2 foram identificados 1903 miRNAs capazes de interagir com o mRNA codificado pelo gene *TNF- α* , sendo estes: 587 miRNAs na posição 3'UTR, 249 na posição 5'UTR e 1.067 na posição CDS. Ainda, foram identificados 896 miRNAs capazes de interagir com o mRNA codificado pelo gene *IL-1 β* , sendo estes: 295 miRNAs na posição 3'UTR, 98 na posição 5'UTR e 503 na posição CDS.

Tabela 2 - Quantidades de miRNA que interagem com os genes *TNF- α* e *IL-1* e suas respectivas posições de ligação.

Gene	Posição	Quantidade de miRNA
<i>TNF-α</i>	3'UTR	587
	5'UTR	249
	CDS	1.067
<i>IL-1β</i>	3'UTR	295
	5'UTR	98
	CDS	503
TOTAL		2799

Fonte: Do autor

6.7.1 O mmu-miR-181a-5p é predito interferir com a expressão de *TNF-α* e *IL-1β*.

Como houve diminuição da expressão tanto de *TNF-α* quanto de *IL-1β*, foi verificado aqueles que são preditos de regular ambos genes. Seiscentos e sessenta e dois miRNAs foram preditos de interagir com o mRNA codificador de ambas citocinas (Fig. 12A). Desta forma, a figura 12B demonstra o sítio de ligação do mmu-miR-181a-5p com o mRNA na posição 3' UTR do *TNF-α*. E é possível também verificar a interação do miRNA na posição CDS do mRNA da citocina *IL-1β* (Fig. 12C), assim pressupõe-se que o mmu-miR-181a-5p pode ter ação em ambos os genes. Recentemente nosso grupo de pesquisa determinou o papel do mmu-mmu-miR-181a-5p na regulação da expressão de *TNF-α* em modelo de BMDMs infectados por bactérias para evadir da resposta imune inata (CORSETTI et al., 2018). Sendo assim, este trabalho propõe como perspectiva analisar a expressão desse miRNA sob condições de infecção de BMDMs pelo ZIKV previamente infectado pelo DENV4 e comparar com células previamente infectadas pelo DENV1, por exemplo, para melhor entendimento da regulação da resposta imune inata por diferentes sorotipos do DENV em infecções pelo ZIKV.

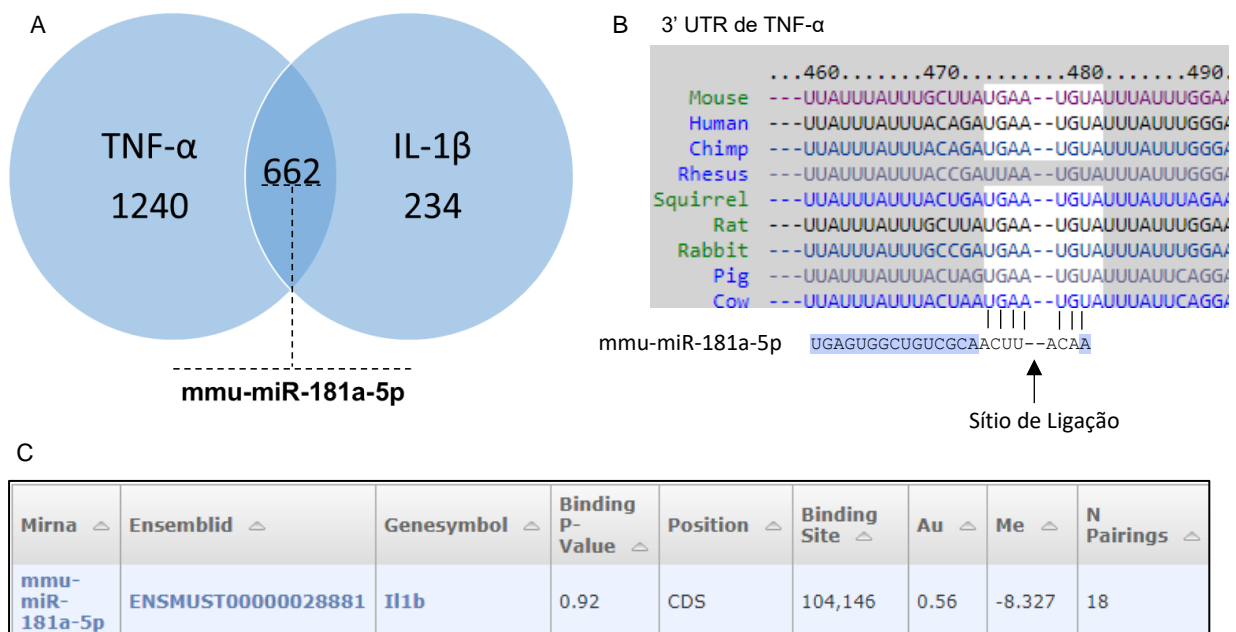


Figura 12 - O mmu-miR-181a-5p é predito interferir com a expressão de *TNF-α* e *IL-1β*. **A**: Número total de miRNAs de *TNF-α*, *IL-1β* e quantidade de miRNAs que fazem parte de ambos. **B**: Sítio de ligação do mmu-miR-181a-5p com a posição 3' UTR do *TNF-α*. **C**: Interação do mmu-miR-181a-5p na posição CDS do mRNA da citona *IL-1β*.

7 DISCUSSÃO

Apesar de grandes avanços no estudo da resposta imune contra o ZIKV, muitos trabalhos tem evidenciado o papel da resposta imune adaptativa (LIMA et al., 2017; TRIPP; ROSS, 2016; WEN; SHRESTA, 2017). O presente estudo demonstrou de forma inédita que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados pelo ZIKV associada a uma infecção prévia pelos 4 sorotipos, apresentaram um aumento significativo na expressão de CD80 e CD86 apenas quando tais células foram infectadas pelo sorotipo DENV4. Todavia, este mesmo grupo DENV4/ZIKV apresentou uma diminuição na expressão de genes pró-inflamatórios (*TNF- α* e *IL-1 β*) e antiviral (*IFN- β*). Análises de bioinformática indicaram um possível controle da expressão de *TNF- α* e *IL-1 β* pelo mmu-miR-181a-5p, que é induzido pela ativação da via de NF- κ B.

Para obtenção dos resultados deste trabalho as células da medula óssea murina foram diferenciadas em macrófagos como fonte de célula de imunidade inata característica de ser infectada pelo ZIKV e pelo DENV. Após 10 dias de diferenciação as culturas celulares foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD11b a fim de demonstrar que as células presentes no meio de cultura tinham se diferenciado em macrófagos (KHAZEN et al., 2005). Tal processo de diferenciação foi obtido com sucesso uma vez que mais de 95% dos eventos analisados por citometria de fluxo foram positivos para esse marcador de membrana. O polipeptídeo CD11b-integrina (alfaM) se emparelha com o polipeptídeo CD18-integrina para formar uma integrina Mac-1 funcional. O Mac-1 é predominantemente expresso em células mieloides, como macrófagos, neutrófilos e DCs (MORELLI et al., 2012; TAN, 2012). Os resultados obtidos, em consonância com as evidências bibliográficas e com os resultados observados na imunofluorescência realizada, confirmaram a diferenciação viabilizando a continuação dos procedimentos experimentais com as análises de ativação celular pela análise da expressão de CD80 ou CD86 na membrana dessas células frente a infecção de DENV e ZIKV.

A ativação dos macrófagos são de extrema importância para o sistema imune inato, uma vez que CD80 e CD86 são moléculas co-estimulatórias necessárias para a ativação de células T (PENTCHEVA-HOANG et al., 2004). Nesse contexto, foi identificado que as infecções isoladas com DENV1 e DENV2 apresentaram diminuição significativa na expressão de CD80. Tal resultado pode ser corroborado

pelo trabalho de Torres e colaboradores (2013) que verificou a expressão de CD80 e CD86 em pacientes com DF e DHF, observando a diminuição da expressão dessa molécula co-estimulatória nas amostras analisadas (TORRES et al., 2013). Por outro lado, Wu e colaboradores (2011), mostraram que há aumento da expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas obtidas de monócitos CD14+ humanos quando infectadas pelo DENV2 nas 4 primeiras horas (WU et al., 2011). Neste trabalho foram utilizados BMDMs murinos que quando estimulados com DENV2 não apresentam aumento de expressão dos co-estimuladores. Logo, para análise dos mecanismos de uma estimulação primária com um agente estranho, é importante que células diferenciadas *in vitro* sejam utilizadas e não aquelas já em circulação.

Ainda, foi possível observar um aumento da expressão de CD80 e CD86 no grupo DENV4/ZIKV quando comparado ao grupo DENV4. Nenhum outro trabalho evidenciou tal resposta de células da imunidade inata frente à infecção por ambos vírus.

Ademais, os resultados aqui apresentados demonstraram que não houve diferença estatística para a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 quando comparado o grupo que foi infectado somente com ZIKV em relação aos NI. Este resultado é corroborado por um estudo recente em que verificou-se diversos isolados de ZIKV quanto a sua regulação para as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, observando que não houve regulação positiva em células dendríticas quando comparadas ao grupo controle. Dessa forma, garantindo a capacidade de interferir com a ativação e maturação de DC é possível resultar em respostas imunitárias retardadas e ajudar na compreensão da capacidade do ZIKV de alcançar locais imunoprivilegiados (VIELLE et al., 2018).

As citocinas denominadas de IFN tipo I (IFN- α / β) são produzidas em resposta à infecção viral e representa o mecanismo antiviral mais eficiente (KOTENKO, 2011). Todavia, neste trabalho houve uma diminuição significativa da expressão do gene *IFN- β* em todos os grupos avaliados quando comparados ao grupo NI. Dessa forma, estudos que demonstraram uma diminuição na expressão de genes induzidos pelo IFN- β , especificamente aqueles envolvidos na via de sinalização dessa citocina, e que as principais moléculas responsáveis por esse bloqueio são as múltiplas proteínas não estruturais flavivirais, incluindo NS2A, NS4A, NS4B e NS5 (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2005; SUTHAR; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2013), estão de acordo com os resultados do nosso trabalho. De forma bastante interessante, nem nos grupos de

macrófagos infectados com ZIKV previamente infectados pelos sorotipos de DENV foi observado qualquer tipo de aumento significativo de uma resposta antiviral. Tal efeito possui papel central na evasão dos vírus frente a uma resposta imune inata antiviral uma vez que a inibição da expressão de IFN- β evitará a sinalização mediada pelo receptor de IFN tipo I (IFNAR). Estudos com animais deficientes para este receptor demonstrou tanto a suscetibilidade frente a infecção por DENV quanto para ZIKV sugerindo a importância desta via de sinalização para o desencadeamento de uma resposta imune efetiva contra esses vírus (DOWALL et al., 2016; OROZCO et al., 2012; PERRY et al., 2011; PRESTWOOD et al., 2012b).

Após o reconhecimento dos PAMPs, tais como LPS e dsRNA, macrófagos ficam ativados e secretam uma ampla variedade de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IL-1 β e TNF- α , que podem auxiliar a resposta imune do hospedeiro (MURRAY et al., 2014, MOSSER, EDWARDS, 2008). Neste contexto, foi observado neste trabalho o aumento da expressão do gene codificador de TNF- α nas infecções isoladas com os sorotipos DENV1, DENV3 e DENV4 em relação ao NI. Corroborando os resultados aqui encontrados com o trabalho de Masood e colaboradores, 2018 que quantificou a expressão de TNF- α em pacientes com sinais de dengue, febre da dengue e dengue severa, demonstrando um aumento desse gene pró-inflamatório em todas as amostras analisadas em relação ao grupo controle saudável, mas não foi encontrada diferença entre os grupos que apresentavam a infecção (MASOOD et al., 2018).

Filliol e colaboradores (2017) observaram que em pacientes com hepatite crônica pode ocorrer a morte aguda de hepatócitos, induzindo uma alta e rápida taxa de mortalidade. Ainda, a produção fisiológica de TNF- α pelas células de Kupffer ativado pelo LPS leva o hepatócito à apoptose (FILLIOL et al., 2017). Tais resultados corroboram com os dados identificados no presente estudo, tendo em vista que há uma relação inversamente proporcional entre a expressão do gene pró-inflamatório TNF- α e a viabilidade celular, observando-se uma baixa produção de TNF- α e alta viabilidade celular para os grupos DENV2 e DENV2/ZIKV. Ao contrário, para o grupo DENV4 foi observado uma alta produção de TNF- α e baixa viabilidade celular. No entanto, já na presença da infecção pelo ZIKV no grupo previamente infectado pelo DENV-4, a resposta anteriormente observada foi revertida, observando-se o aumento da viabilidade celular frente à diminuição na produção da citocina TNF- α .

Outro importante componente pró-inflamatório da imunidade inata é a citocina IL-1 β , níveis séricos de IL-1 β correlacionam-se com a gravidade da doença em pacientes com dengue (SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010). Neste trabalho foi demonstrado que quando os BMDM são infectados apenas com DENV4 há um aumento significativo na expressão de IL-1 β , como observado em outro estudo de Cheung et al., 2017 demonstrando que a infecção por DENV aumentou a expressão de IL-1 β em macrófagos humanos (CHEUNG et al., 2017).

De forma bastante intrigante e contrária ao demonstrado pelo aumento da ativação dos macrófagos do grupo DEN4/ZIKV, foi observada redução significativa na expressão de IL-1 β e TNF- α . Estudos com células tronco humanas pluripotentes quando infectadas por DENV ativam fortemente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), consistente com a patogênese da dengue. Por outro lado, a infecção pelo ZIKV resulta em pouca indução das citocinas pró-inflamatórias (LANG et al., 2018), o que acarreta em uma resposta imunológica mais fraca e prolongada infecção viral. Neste trabalho, temos como importante foco a coinfeção pelos dois vírus em momentos diferentes, sugerindo que uma infecção prévia por DENV4 seguida da infecção pelo ZIKV pode modular a expressão dos genes pró-inflamatórios mesmo com aumento da expressão de co-estimuladores.

A diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios independente da ativação macrofágica podendo sugerir a existência de algum mecanismo induzido pela infecção desses dois vírus, particularmente pelo sorotipo DENV4 e ZIKV, que pode influenciar no aumento da expressão de uma resposta pró-inflamatória. Baseado em estudos prévios de nossa equipe de pesquisa (CORSETTI et al., 2018) e, utilizando dados da bioinformática, foi realizada a busca por miRNAs que pudessem interagir com ambos os genes em questão. Muitos trabalhos tem evidenciado o papel dos miRNAs no controle da expressão tanto de TNF- α quanto de IL-1 β em infecções virais. Um trabalho que corrobora com os resultados aqui encontrados e de Haneklaus e colaboradores, 2012 demonstraram que quando macrófagos são infectados pelo Vírus Epstein-Barr ocorre um aumento da produção de miR-223 e miR-BART15 e esses regulam diminuindo a ativação dos inflamassomas levando a queda da expressão de IL-1 β (HANEKLAUS et al., 2012). Um outro exemplo é o que Sarma e colaboradores, 2012 demonstraram que o vírus da hepatite C pode diminuir a regulação do miR-449a, por sua vez aumentando a produção de TNF- α dos macrófagos do tecido hepático,

assim aumentando o risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (SARMA et al., 2012).

Os resultados da bioinformática indicaram que 1240 miRNAs são capazes de interagir apenas com TNF- α , 234 miRNAs interagem apenas com IL-1 β e 662 miRNAs atuam em ambos os genes nas posições 3UTR, 5UTR ou CDS. Dentre estes últimos, está o miR181a-5p que pode exercer seus efeitos anti-inflamatórios devido a inibição do aumento de genes pró-inflamatórios, IL-1 α , bem como IL-1 β e TNF- α (XIE et al., 2013).

Uma provável explicação para esta diminuição observada na expressão de *TNF- α* e *IL-1 β* pode estar relacionada a presença do miRNA miR181a-5p, que por sua vez, atua interferindo em nível pós-transcricional desses genes. Ou seja, mesmo com o aumento da expressão dos marcadores de ativação, CD80 e CD86, nos macrófagos infectados por ZIKV e previamente infectados por DENV4, há uma queda na expressão de genes pró-inflamatórios. Assim o ZIKV passaria a modular resposta imune inata quando presente na co-infecção com DENV4. Casseb e colaboradores, 2016, demonstraram que os miRNAs não apenas regulam a sinalização de TLR e IL-1, mas também podem ser induzidos durante a infecção pelo DENV4, exercendo controle sobre o sistema imune inato do hospedeiro (CASSEB et al., 2016).

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem sugerir, de acordo com o modelo abaixo representado (Fig. 13), que uma co-infecção pelo sorotipo 4 de DENV e ZIKV em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos, aumenta a expressão de CD80 e CD86 favorecendo a ativação dos macrófagos, porém se verifica uma diminuição na expressão diferencial dos genes pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β , evidenciado também pela maior viabilidade celular. Esses resultados sugerem que exista uma modulação dessa ativação inflamatória por miRNAs como o mmu-mmu-miR-181a-5p, demonstrado por dados da bioinformática, sendo necessários mais estudos para compreender a relação deste miRNA com a co-infecção de DENV4 e ZIKA.

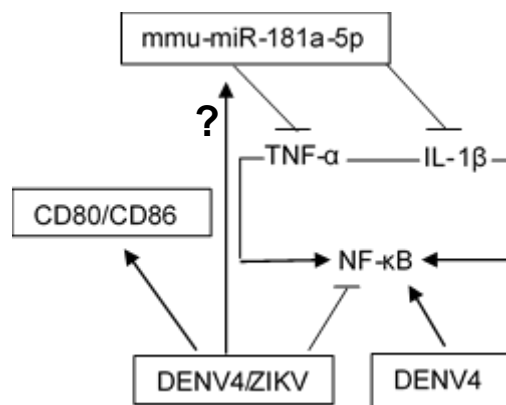


Figura 13 - Modelo proposto de aumento da expressão de CD80/CD86 pelo DENV4/ZIKV, todavia levando a inibição da alça de feedback positivo de NF- κ B-TNF- α -IL-1 β via mmu-miR-181a-5p? Nos macrófagos, a ativação da via de sinalização NF- κ B aumenta a expressão de TNF- α e IL-1 β , o que, por sua vez, o DENV4 ativa ainda mais a sinalização de NF- κ B. No entanto o DENV4/ZIKV aumenta a expressão de CD80/CD86. O DENV4/ZIKV, mas não o DENV4, interrompe a malha de retroalimentação positiva NF- κ B-TNF- α -IL-1 β , inibindo a via de sinalização NF- κ B via mmu-miR-181a-5p.

Fonte: Do autor

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K. M. et al. Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–14, 2017.
- AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, n. AUGUST2015, p. 1–38, 2015.
- AID, M. et al. Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 610–620.e14, 2017.
- ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 6, p. 511–528, 2007.
- ALCANTARA, D.; O'DRISCOLL, M. Congenital microcephaly. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 166, n. 2, p. 124–139, 2014.
- AMADOR-CAÑIZARES, Y. et al. miR-122 does not impact recognition of the HCV genome by innate sensors of RNA but rather protects the 5' end from the cellular pyrophosphatases, DOM3Z and DUSP11. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 10, p. 5139–5158, 2018.
- ANSAR, V.; VALADI, N. Guillain-Barré syndrome. **Primary care**, v. 42, n. 2, p. 189–93, jun. 2015.
- ASHOUR, J. et al. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 5, p. 410–421, 2010.
- ASIA, W. R. O. FOR S.-E. **Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**. [s.l.], 2011.
- BARTEL, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 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.
- BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2010.
- BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846–860, 2011.
- BERNSTEIN, E. et al. Dicer is essential for mouse development. **Nature Genetics**, v. 35, n. 3, p. 215–217, 2003.

BETEL, D. et al. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. **Genome Biology**, v. 11, n. 8, 2010.

BHATIA, S. et al. Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: Implications for signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15569–15574, 2005.

BHATIA, S. et al. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. **Immunology Letters**, v. 104, n. 1–2, p. 70–75, 2006.

BHATNAGAR, J. et al. Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 405–414, 2017.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BHATTACHARYYA, S. et al. Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 2, p. 136–147, 2013.

BLACKLEY, S. et al. Primary Human Splenic Macrophages, but Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus Infection In Vitro. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13325–13334, 2007.

BRACHT, J. et al. Transcripts Trans -splicing and polyadenylation of let-7 microRNA. p. 1586–1594, **US 8,309,533 B2**, 2004.

BRADY, O. J. et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 338, 2014.

BRASIL. **Casos de Dengue, 2017**. Ministério da Saúde, Brasília, 2017a.

BRASIL. **Casos de Zika, 2017**. Ministério da Saúde, Brasília, 2017b.

BRASIL. **Situação epidemiológica dengue de 2016 a 2018**. Ministério da Saúde, Brasília, 2018.

BRASIL. **Situação epidemiológica Zika, 2018**. Ministério da Saúde, Brasília, 2018.

BRAULT, J. B. et al. Comparative Analysis Between Flaviviruses Reveals Specific Neural Stem Cell Tropism for Zika Virus in the Mouse Developing Neocortex. **EBioMedicine**, v. 10, p. 71–76, 2016.

BROMLEY, S. K. et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. **Nature Immunology**, v. 2, n. 12, p. 1159–1166, 2001.

BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA Functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 175–205, 2007.

- CAI, X.; HAGEDORN, C. H.; CULLEN, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **Rna**, v. 10, n. 12, p. 1957–1966, 2004.
- CAMPOS, G.; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1881, 2015.
- 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.
- CARDIER, J. E. et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. **Cytokine**, v. 30, n. 6, p. 359–365, 2005.
- CAROLINA, A. et al. Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in dengue-primed Zika-infected patients. **Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America**, p. 16, 2017.
- CARTHAGENA, L. et al. Human TRIM gene expression in response to interferons. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.
- CASSEB, S. M. M. et al. Drosha, DGCR8, and Dicer mRNAs are down-regulated in human cells infected with dengue virus 4, and play a role in viral pathogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.
- CERNY, D. et al. Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014.
- CHAN, Y. K.; GACK, M. U. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 360–373, 13 maio 2016.
- CHAVES, B. A. et al. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 4, p. 563–571, 2018.
- CHEMNITZ, J. M. et al. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 945–954, 2004.
- CHEN, J. C. et al. Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 139–140, 2016.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Transmission of Dengue Virus without a Mosquito Vector: Nosocomial Mucocutaneous Transmission and Other Routes of Transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. e56–e60, 2004.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Dengue and chikungunya infections in travelers. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 438–444, 2010.

CHEUNG, K. T. et al. Involvement of caspase-4 in IL-1 beta production and pyroptosis in human macrophages during dengue virus infection. **Immunobiology**, 2017.

CHONG, M. M. W. et al. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. **Genes and Development**, v. 24, n. 17, p. 1951–1960, 2010.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, 2006.

COLLINS, M.; LING, V.; CARRENO, B. M. The B7 family of immune-regulatory ligands. **Genome Biology**, v. 6, n. 6, p. 1–7, 2005.

COLT, S. et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 2017.

CORSETTI, P. P. et al. miR-181a-5p regulates TNF- α and miR-21a-5p influences gualynate-binding protein 5 and IL-10 expression in macrophages affecting host control of *Brucella abortus* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 2018.

COSTA, V. V. et al. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 12–15, 2012.

COSTA, V. V. et al. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 6, p. 1950–1961, 2013.

DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016.

DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1–8, 2011.

DE WAZIÈRES, B. et al. Nosocomial transmission of dengue from a needlestick injury. **The Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 498, 1998.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in human. **Science**, v. 328, n. Mai, p. 745–748, 2010.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Lectin switching during dengue virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 12, p. 1775–1783, 2011.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Transactions of the Royal Society of. v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DIEBOLD, S. S. et al. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1529–1531, 2004.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 7 abr. 2011.

DOWALL, S. D. et al. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2016.

DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016.

DURBIN, A. P. et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. **Virology**, v. 376, n. 2, p. 429–435, 2008.

ENFISSI, A. et al. Zika virus genome from the Americas. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 227–228, 2016.

FAGUNDES, C. T. et al. IFN-gama production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 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.

FILLIOL, A. et al. RIPK1 protects hepatocytes from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced hepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 6, p. 1205–1213, 2017.

FURTADO, J. M. et al. Uveitis Associated with Zika Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 4, p. 394–396, 2016.

GACK, M. U.; DIAMOND, M. S. Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 20, p. 119–128, out. 2016.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n. Mid, p. 1, 2018.

GOMES, L. et al. Sphingosine 1-phosphate in acute dengue infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–509, 2008.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p. 215–227, 2004.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. the B7 Family Revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 515–548, 2005.

GRIMSON, A. et al. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing. v. 27, n. 1, p. 91–105, 2013.

GRINGHUIS, S. I. et al. **Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome** *Nature Immunology*, 2012.

GROSSWENDT, S. et al. Unambiguous Identification of miRNA:target site Interactions by Different Types of Ligation Reactions. **Molecular cell**, v. 54, n. 6, p. 1042–1054, 2015.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, 2002.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–840, 2011.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007.

HALSTEAD, S. B. Dengue Virus–Mosquito Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 53, n. 1, p. 273–291, 2008.

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

HANCOCK, W. T.; MARFEL, M.; BEL, M. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 11, p. 1960, 2014.

- HANEKLAUS, M. et al. Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 Production. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 8, p. 3795–3799, 2012.
- HANNANI, D. et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: Obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25. **Cell Research**, v. 25, n. 2, p. 208–224, 2015.
- HATHCOCK, K. S. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 631–640, 1994.
- HELWAK, A. et al. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 654–665, 2013.
- HEMMI, H. et al. Small-antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 3, n. 2, p. 196–200, 2002.
- HIRSCH, A. J. et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 3, p. 1–23, 2017.
- HOTTZ, E. D. et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405–3414, 14 nov. 2013.
- HOU, W. et al. Determination of the Cell Permissiveness Spectrum, Mode of RNA Replication, and RNA-Protein Interaction of Zika Virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.
- HUANG, G. p38alpha signaling programs dendritic cells to drive TH17 cell differentiation and autoimmune inflammation. **Nature Immunology**, v. 13, n. 2, p. 152–161, 2012.
- JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 7, p. 421–433, 2015.
- JOPLING, C. L.; SCHÜTZ, S.; SARNOW, P. Position-dependent Function for a Tandem MicroRNA miR-122 Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 1, p. 77–85, 2008.
- KARABATSOS, N. **International catalogue of arthropod-borne viruses**. 3. ed. San Antonio: Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses by the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985.
- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

KELSER, E. A. Meet dengue's cousin, Zika. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 3, p. 163–166, 2016.

KHAZEN, W. et al. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. **FEBS Letters**, v. 579, n. 25, p. 5631–5634, 2005.

KING, A. M. Q. et al. **Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses**. San Diego, CA: [s.n.].

KOPF, M. et al. Inducible Costimulator Protein (Icos) Controls T Helper Cell Subset Polarization after Virus and Parasite Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 1, p. 53–62, 2000.

KOTENKO, S. V. IFN- λ s. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 5, p. 583–590, out. 2011.

KUNO, G. et al. Biological Transmission of Arboviruses : Reexamination of and New Insights into Components , Mechanisms , and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends Biological Transmission of Arboviruses. **Reexamination of and New Insights into Components** ,v. 18, n. 4, p. 608–637, 2005.

LANDGRAF, P. et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1401–1414, 2007.

LANG, J. et al. An hPSC-Derived Tissue-Resident Macrophage Model Reveals Differential Responses of Macrophages to ZIKV and DENV Infection. **Stem Cell Reports**, v. 11, n. 2, p. 348–362, 2018.

LANTERI, M. C.; BUSCH, M. P. Dengue in the context of “safe blood” and global epidemiology: To screen or not to screen? **Transfusion**, v. 52, n. 8, p. 1634–1639, 2012.

LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny {RNA}s with probably regulatory roles in {Caenorhabditis elegans}. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858–862, 2001.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LI, H. et al. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 593–598, 2016.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.

- LIM, L. P. et al. The microRNAs of *C. elegans*. **Genes & Development**, p. 991–1008, 2003.
- LIM, W. et al. Regulation of B7.1 Costimulatory Molecule Is Mediated by the IFN Regulatory Factor-7 through the Activation of JNK in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5690–5700, 1 nov. 2005.
- LIMA, N. S. et al. T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 8, p. 594–605, 2017.
- LIN, S. C.; LO, Y. C.; WU, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885–890, 2010.
- LIU, S. et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. **Science**, v. 347, n. 6227, p. aaa2630-aaa2630, 2015.
- LOO, Y.-M. et al. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 335–345, 2008.
- LOO, Y. M.; GALE, M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 680–692, 2011.
- LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698–23708, 2005.
- LUNA, J. M. et al. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. **Cell**, v. 160, n. 6, p. 1099–1110, 2016.
- LUND, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 15, p. 5598–5603, 2004.
- MALKKI, H. CNS infections: Zika virus infection could trigger Guillain–Barré syndrome. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 4, p. 187–187, 2016.
- MAMMEN, M. P. et al. Spatial and temporal clustering of dengue virus transmission in Thai villages. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1605–1616, 2008.
- MASOOD, K. I. et al. Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in Dengue disease severity. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 202–207, 2018.
- MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544–557, 2012.
- MERWE, P. A. VAN DER; DAVIS, S. J. MOLECULAR INTERACTIONS MEDIATING TCELL ANTIGEN RECOGNITION. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 659–684, 2003.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.

MESTDAGH, P. et al. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF β -pathway in neuroblastoma. **Molecular Cell**, v. 40, n. 5, p. 762–773, 2011.

MILLER, J. L. et al. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e17, 2008.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. **Immunology and Cell Biology**, n. December 2016, p. 1–5, 2017.

MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 5, p. 296–305, 2017.

MORELLI, A. E. et al. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells : dependence on complement receptors and effect on cytokine production Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells : depend. v. 101, n. 2, p. 611–620, 2012.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. **Journal of virology**, v. 79, n. 13, p. 8004–8013, 2005.

MURRAY, C. J. E. AL. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: Quantifying the epidemiological transition. **The Lancet**, v. 386, n. 10009, p. 2145–91, 2015.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 299–309, 2013.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

NASIRUDEEN, A. M. A. et al. RIG-i, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, 2011.

NEMES, Z. et al. Nosocomial Transmission of Dengue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1880–1881, 2004.

NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. M. Circulating Cytokines as Mediators of Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. Supplement 5, p. S178–S184, 1 out. 2000.

NGUYEN, S. M. et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–22, 2017.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.

OROZCO, S. et al. Characterization of a model of lethal dengue virus 2 infection in C57BL/6 mice deficient in the alpha/beta interferon receptor. **Journal of General Virology**, v. 93, n. PART 10, p. 2152–2157, 2012.

OSUNA, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nature Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1448–1455, 2016.

OTTO, G. A.; PUGLISI, J. D. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. **Cell**, v. 119, n. 3, p. 369–380, 2004.

PACSA, A. S. et al. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 28, n. 2, p. 151–155, 2000.

PAIXÃO, E. S. et al. History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: A systematic review. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 606–612, 2016.

PALMER, D. R. et al. Differential Effects of Dengue Virus on Infected and Bystander Dendritic Cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2432–2439, 15 fev. 2005.

PENTCHEVA-HOANG, T. et al. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 401–413, 2004.

PERRY, S. T. et al. STAT2 mediates innate immunity to dengue virus in the absence of STAT1 via the type I interferon receptor. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.

PESSÔA, R. et al. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3201, 2016.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.

POECK, H. et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 β production. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 63–69, 15 jan. 2010.

PRASAD, V. M. et al. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 24, n. 2, p. 184–186, 2017.

PRECIOSO, A. R. et al. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7121–7125, 2015.

PRESTWOOD, T. R. et al. Trafficking and Replication Patterns Reveal Splenic Macrophages as Major Targets of Dengue Virus in Mice. **Journal of Virology**, v. 86, n. 22, p. 12138–12147, 2012a.

PRESTWOOD, T. R. et al. Gamma Interferon (IFN- γ) Receptor Restricts Systemic Dengue Virus Replication and Prevents Paralysis in IFN- γ Receptor-Deficient Mice. **Journal of Virology**, v. 86, n. 23, p. 12561–12570, 2012b.

RETALLACK, H. et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 50, p. 14408–14413, 2016.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R. et al. Dengue Virus Inhibits the Production of Type I Interferon in Primary Human Dendritic Cells. **Journal of Virology**, v. 84, n. 9, p. 4845–4850, 1 maio 2010.

ROGERS, D. J. et al. The Global Distribution of Yellow Fever and Dengue. **Advances in Parasitology**, v. 62, n. 05, p. 181–220, 2006.

ROSENBERG, A. Z. et al. Placental pathology of zika virus: Viral infection of the placenta induces villous stromal macrophage (Hofbauer Cell) proliferation and hyperplasia. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 1, p. 43–48, 2017.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011.

SAN MARTÍN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128–135, 2010.

SANSOM, D. M. CD28, CTLA-4 and their ligands: Who does what and to whom? **Immunology**, v. 101, n. 2, p. 169–177, 2000.

SARMA, N. J. et al. Hepatitis C Virus Mediated Changes in miRNA-449a Modulates Inflammatory Biomarker YKL40 through Components of the NOTCH Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

SAVIDIS, G. et al. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. **Cell Reports**, v. 16, n. 1, p. 232–246, 2016a.

SAVIDIS, G. et al. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2323–2330, 2016b.

SCHEEL, T. K. H. et al. Functional Sequestration. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 3, p. 409–423, 2017.

SCHMID, M. A.; HARRIS, E. **Monocyte Recruitment to the Dermis and Differentiation to Dendritic Cells Increases the Targets for Dengue Virus Replication** **PLoS Pathogens**, 2014.

SCHMIDT, C. W. Zika in the United States how are we preparing? **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 9, p. A158–A165, 2016.

SCHWARTZ, D. A. Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 295, n. 6, p. 1361–1368, 2017.

SEDANO, C. D.; SARNOW, P. Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2. **Cell**, v. 16, n. 1, p. 1–23, 2014.

SELBACH, M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 58–63, 2008.

SETH, R. B. et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 669–682, 2005.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 116–126, 2002.

SHURTLEFF, A. C. et al. Genetic Variation in the 3' Non-Coding Region of Dengue Viruses. **Virology**, v. 281, n. 1, p. 75–87, 2001.

SILVA, R. L. A. et al. Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions. **Virus Research**, v. 135, n. 2, p. 320–325, 2008.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 339–348, jul. 1964.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 22 abr. 2016.

SPROKHOLT, J. K. et al. RIG-I-like Receptor Triggering by Dengue Virus Drives Dendritic Cell Immune Activation and T H 1 Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 198, p. 1–9, 15 maio 2017.

SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. **Markers of Dengue Disease Severity**. In: 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 67–82.

SUTHAR, M. S.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate Immune Sensing of Flaviviruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 5–8, 2013.

SWARTS, D. C. et al. The evolutionary journey of Argonaute proteins. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 21, n. 9, p. 743–753, 2014.

TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 2, p. 155–166, 2016.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TAN, J. J. L. et al. Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2017.

TAN, S. The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 3, p. 241–269, 2012.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.

TEIXEIRA, M. G. et al. The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: Detection, control, etiology, and future scenarios. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 601–605, 2016.

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.

TOPALIAN, S. L. et al. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 27, n. 4, p. 450–461, 2016.

TORRES, S. et al. Differential Expression of Toll-like Receptors in Dendritic Cells of Patients with Dengue during Early and Late Acute Phases of the Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, 2013.

TRIPP, R. A.; ROSS, T. M. Development of a Zika vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 9, p. 1083–1085, 2016.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity. **Skin Research**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2008.

UHLMANN, S. et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. **Molecular Systems Biology**, v. 8, n. 570, p. 1–15, 2012.

VAN DER EIJK AA, VAN GENDEREN PJ, VERDIJK RM, REUSKEN CB, M. R. Miscarriage associated with Zika virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 10, p. 1000–1002, 2016.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. **Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence**. [s.l.] Elsevier Inc., 2008. v. 72

- VENTURA, C. V. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016.
- VERSTEEG, G. A. et al. Receptors. v. 38, n. 2, p. 384–398, 2014.
- VIELLE, N. J. et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- VOGEL, I. et al. CD28/CTLA-4/B7 costimulatory pathway blockade affects regulatory T-cell function in autoimmunity. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1832–1841, 2015.
- VON BERNUTH, H. et al. Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 12, p. 3126–3135, 2012.
- WANG, J. P. et al. Flavivirus Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Delineates Key Elements of TLR7 Signaling beyond Endosomal Recognition. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7114–7121, 2006.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. **Present and Future Arboviral Threats**. [s.l: s.n.]. v. 85
- WEBSTER, D. P.; KLENERMAN, P.; DUSHEIKO, G. M. Hepatitis C. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9973, p. 1124–35, 2015.
- WELLS, M. F. et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 6, p. 703–708, 2016.
- WEN, J.; SHRESTA, S. T Cell Immunity to Zika and Dengue Viral Infections. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 37, n. 11, p. 475–479, 2017.
- WHO. **Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever**. [s.l: s.n.].
- WHO. WHO. Dengue and severe dengue: Fact Sheet No 117. 2016. 2016.
- WILDER-SMITH, A. et al. Update on dengue: Epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 157–164, 2010.
- WONG, N.; WANG, X. miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D146–D152, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. x, 147, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO | Dengue and severe dengue** WHO World Health Organization, , 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 7 jun. 2017

WU, M.-F. et al. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 95–106, 3 jan. 2013.

WU, S. J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature medicine**, v. 6, n. 7, p. 816–20, 2000.

WU, W.-L. et al. Immunosuppressive Effects and Mechanisms of Leflunomide in Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. **Journal of Clinical Immunology**, v. 31, n. 6, p. 1065–1078, 2011.

WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, v. 3, p. 17006, 2017.

XIE, W. et al. miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

YOCKEY, L. J. et al. Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1247–1256.e4, 2016.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 32–35, 2015.

ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Enhanced Infection of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in a Mouse Model of Antibody-Induced Severe Dengue Disease. **Cell Host and Microbe**, v. 7, n. 2, p. 128–139, 2010.

ZHANG, X. et al. HHS Public Access. v. 20, n. 1, p. 105–110, 2013.

ZHANG, Y.-A. et al. Conservation of Structural and Functional Features in a Primordial CD80/86 Molecule from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), a Primitive Teleost Fish. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 83–96, 2009.

ZHOU, H. et al. IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NFκB activation and cytokine production. **EMBO Journal**, v. 32, n. 4, p. 583–596, 2013.

ZHOU, Y. et al. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3-untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 9, p. 2595–2603, 2006.

ANEXOS

A - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL-MG, sob registro 70-2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da resposta imune inata após a infecção pelo Zika vírus em células dendríticas e macrófagos previamente infectados com Dengue vírus", registrada com o nº 70/2017, sob a responsabilidade de Leonardo Augusto de Almeida, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 23/11/2017 a 01/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6 / isogênico
Nº de animais	5
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMG

Alfenas, 23 de Novembro de 2017.

Paulo Márcio de Faria e Silva
 Reitor/UNIFAL-MG