UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Migração de leucócitos para o sistema nervoso central na infecção experimental por vírus ZIKV

Herculano da Silva

RIBEIRÃO PRETO
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Migração de leucócitos para o sistema nervoso central na infecção experimental por vírus ZIKV

Herculano da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do titulo de Mestre em Ciências. Área Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva
Co-Orientadora: Dra. Luciana Benevides

RIBEIRÃO PRETO
2018

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que citada á fonte.

FICHA CATOLOGRÁFICA

Silva, Herculano da Silva

Migração de leucócitos para o sistema nervoso central na infecção experimental por vírus ZIKV

Ribeirão preto, 2018, 70 P. : 1l. ; 30 cm

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do titulo de Mestre em Ciências.

Orientador: João Santana da Silva.

Co-orientadora: Luciana Banavides.

1- Modelo experimental, 2- Vírus ZIKA, 3- Monócitos inflamatórios.

Nome: Herculano da Silva

Titulo: **Migração de leucócitos para o sistema nervoso central na infecção experimental por vírus ZIKV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do titulo de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Santana da Silva

Instituição: FMRP-USP

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento

Dedicatória

Aos meus pais

José da Silva e a minha Mãe Domingos Dias, pelo apoio e por tudo que sempre fizeram para mim, pela simplicidade, exemplo, amizade e carinho fundamentais na construção do meu caráter. Ao companheirismo a mim dedicado durante toda a minha vida trajetória, pelo que só hoje, por todas as alegrias que já passamos juntos e incentivos que trocamos nos momentos difíceis.

Agradecimentos

A Deus por me iluminar, pela sabedoria, dom da vida e pela capacidade de podemos alcançar tudo que almejamos em nossas vidas.

Agradeço ao Prof. Dr. João Santana da Silva, que permitiu a liberdade desta pesquisa. Agradeço pela paciência pelas palavras e pelos conselhos. Agradeço pelo acolhimento e apoio. Agradeço pela oportunidade oferecida para que eu pudesse cumprir esta importante etapa da minha vida.

A Dra. Luciana Benevides**,** agradeço pelo ensinamento, apoio e correção. Agradeço por me ensinar que temos que lutar por aquilo que acreditamos e que temos que ter garra sempre. Agradeço pela sua contribuição, conhecimentos científicos e profissionais e sendo sempre prestativa quando necessitei.

A Profa. Dra. Vanessa Carregaro**,** pelo aprendizado e incentivo ao longo destes anos; foram essenciais para minha formação.

Aos meus pais José da silva e Domingas Dias pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos Antônio da silva, Albino da Silva, Neia da silva, Nivaldo da Silva, Erineu da Silva e Celeste da Silva**,** pelo carinho amor e sabedoria e decas importantes que contribuíram para a minha formação profissional.

Aos meus Tios, Alfredo Dias Fernandes, Dr. Mario Dias Sami, José Dias Fernandes e Tias: Isabel Dias Fernandes e Maria Augusta Dias Fernandes pelo carinho, apoio financeiro e por não medirem esforço para que eu chegasse em mais essa importante etapa da minha vida.

Aos meus sobrinhos, Huvancio Semedo da Silva, Hallyone da Silva Cá e Jandira Biai da Silva, pelo amor, afeto, carinho, alegrias, brincadeiras e todas os sorrisos.

Ao Prof. Dr. Eurico Arruda Neto**,** pela colaboração nesse projeto e disponibilidade de materiais para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. José Luiz Proença pela colaboração nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo pela colaboração nesse projeto e pelas amostras cedidas.

A todos os membros do laboratório de Imunoparasitologia que dividiram comigo o ambiente de trabalho e contribuíram de forma direta ou indiretamente ao longo desses anos.

Aos meus amigos: Jefferson Antonio Leite, Cleyson Barros, Ricardo Camargo e Kiyoshi agradeço por estarem sempre me ajudando, sem vocês o caminho ate aqui teria sido muito mais difícil.

Às minhas amigas: Gabriela Pessenda, Alynne Silva, Isabel Guerra e Tâmara Rodrigues pelo ensinamento e encorajamento, sem vocês o caminho ate aqui teria sido muito mais difícil.

Aos funcionários de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho: Rubilan, Edir, Julio e Dener.

Em especial à Ana Cristina que esteve sempre ao meu lado. Sou imensamente grato pelo apoio e dedicação.

À técnica Cristiane Milaneza agradeço de todos as maneiras. Pela alíquota dos anticorpos e pelos ensinamentos

Ao técnico Wander, Franciele Pioto e Vera agradeço pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, CNPq, FAPESP, FAEPA e IBA pelo incentivo financeiro.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de imunoparasitólogia, coordenado pelo Professor João Santana da Silva- Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto– Universidade de são Paulo.
Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível superior (CAPES)

Lista de Tabelas

Tabela 1-sequência dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real ----------31

Lista de Figuras

Figura 1*:* Modelo experimental de infecção por ZIKV;----------01

Figua 2*:* Expressão de IFN tipo I e do seu receptor no SNC de animais infectados por ZIKV;----------02

Figura 3*:* Quantificação de leucócitos e micróglia no SNC de animais C57BL/6 após a infecção por ZIKV;----------03

Figura 4*:* Quantificação de leucócitos e micróglia no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ após a infecção por ZIKV;----------04

Figura 5: Caracterização de monócitos inflamatórios presentes no SNC de animais C57BL/6 após a infecção por ZIKV;----------05

Figura 6*:* Caracterização de monócitos inflamatórios presentes no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ após a infecção por ZIKV;----------06

Figura 7: Expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no SNC de animais C57BL/6 após a infecção por ZIKV;----------07

Figura 8: Expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ após a infecção por ZIKV;----------08

Figura 9: Detecção da quimiocina CCL2 no SNC de animais infectados por ZIKV;----------09

Figura 10: Quantificação de monócitos inflamatórios em animais deficientes de CCR2, CCR4 e CCR5 infectados com ZIKV;----------10

Figura 11: Expressão de citocinas no SNC de animais C57BL/6 infectados por ZIKV;----------11

Figura 12: Expressão de citocinas no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ infectados por ZIKV----------12

Lista **de abreviaturas**

E	Proteína de Envelope
C	Proteína de capsideo
CZS	Síndrome Congênita do ZIKV
CCL	Quimiocina
DENV	Vírus de Dengue
JEV	Vírus de Encefalite Japonesa
CCR2	Receptor de Quimiocina CCL2
CCR4	Receptor de quimiocina CCL4
CCR5	Receptor de quimiocina CCL5
Cdna	DNA complementar
IL-1β	Interleucina 1beta
IL-6	Interleucina 6
IL-18	Interleucina 18
INFα	Interferon alpha
INF β	Interferon beta
$IFNAR^{-/-}$	Camundongo deficiente de receptor de interferon de tipo I
PrM	Proteína pré-membrana de vírus ZIKV
RNA	Ácido ribonucleico

GBS	Síndrome de Guillain-Barré
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
YFV	Vírus da febre amarela
WWV	Vírus de weste Nilo
WT	Camundongos selvagens

Sumário

Lista de Tabelas----------X

Lista de Figuras----------XI

Lista de abreviaturas----------XII

Resumo----------XIV

1 Introdução---------- 15

1.1 Epidemiologia da infecção por vírus ZIKV---------- **15**

1.2 O Vírus ZIKV---------- **16**

1.3 Resposta imune antiviral---------- **19**

1.4 Modelos experimentais de infecção por ZIKA vírus------ **21**

1.5 Papel dos monócitos na resposta imune antiviral---------- **23**

2 Objetivos---------- 24

2.1 Objetivo geral---------- **25**

2.2 Objetivos específicos---------- **25**

3 Matérias e métodos---------- 26

3.1 Animais---------- **27**

3.2 Propagação e titulação do vírus ZIKV *in vitro*---------- **27**

3.3 Modelo experimental de infecção---------- **28**

3.4 Isolamento de leucócitos do SNC---------- **28**

3.5 Citometria de fluxo---------- **28**

3.6 Extração de RNA---------- **29**

3.7 Síntese de cDNA---------- **29**

3.8 Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)---------- **30**

3.9 Quantificação da carga viral---------- **31**

3.10 Imunohistoquímica---------- **31**

3.10 Analise estatística---------- **32**

4 **Resultado----------** **33**

4.1 Os animais C57BL/6 são resistentes a infecção por ZIKV---------- **34**

4.2 A Infecção por ZIKV modula a produção do IFN de tipo I no SNC- **36**

4.3 Infecção experimental pelo ZIKV induz o recrutamento de leucócitos para o SNC---------- **37**

4.4 Recrutamento de monócitos para o SNC durante a infecção pelo ZIKV é dependente da sinalização de IFNAR---------- **40**

4.5 Infecção experimental com ZIKV induz a expressão de quimiocinas e seus receptores no SNC---------- **43**

4.6 CCR2 é importante para migração de monócitos inflamatórios para SNC durante a infecção pelo ZIKV---------- **46**

4.7 Produção de mediadores inflamatórios é dependente da sinalização de IFNAR durante a infecção pelo ZIKV---------- **48**

5 **Discussão----------** **51**

6 **Conclusão----------** **59**

7 **Referencias bibliográficas----------** **61**

Resumo

Silva, Herculano da silva. **Migração de leucócitos para o sistema nervoso central na infecção experimental por vírus ZIKV.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2018 70 pg.

O vírus ZIKA pertence ao gênero *Flavivírus* e diversos trabalhos têm demonstrado que a infecção por esse vírus está associada com o desenvolvimento de anomalias congênitas fetais e doenças neurológicas como casos de microcefalia e de síndrome de Guillan-Barré. Com intuito de entender os mecanismos imunológicos de controle da replicação viral e na patogênese da doença, o objetivo do trabalho foi estabelecer um modelo experimental de infecção por vírus ZIKV em animais imunocompetentes e investigar a migração de leucócitos para o sistema nervoso central durante a infecção por esse vírus.

Os animais C57BL/6 infectados por ZIKV apresentaram um aumento da carga viral no sistema nervoso central (SNC) após 24 horas de infecção e uma redução significativa após 48 e 72 horas de infecção. No entanto, os animais deficientes do receptor de IFN tipo I (IFNAR$^{-/-}$) apresentaram uma alta carga viral após 48 e 72 horas de infecção. Nossos dados mostram que os animais IFNAR$^{-/-}$ são altamente suscetíveis a infecção com 100% de mortalidade na fase aguda da doença, enquanto os animais C57BL/6 são resistentes a infecção com 100% sobrevida por mais de 30 dias de infecção.

A infecção com ZIKA induziu o recrutamento de duas subpopulações de monócitos CD11b^{+}Ly6C^{hi} e CD11b^{+}Ly6C^{lo} para o SNC de maneira dependente da sinalização de IFN tipo I. Uma vez que, os animais C57BL/6 apresentaram um aumento de monócitos no SNC após 48 horas de infecção, enquanto que os animais IFNAR$^{-/-}$ apresentaram o recrutamento dessas células somente após 72 horas de infecção. De maneira interessante, o recrutamento dos monócitos culminou com um aumento da expressão das citocinas IL-6 e IL-18 no SNC de animais C57BL/6, enquanto que a expressão dessas citocinas não foi encontrada no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$, sugerindo a importância da via de sinalização de IFN tipo I para a produção dessas citocinas.

E por fim, demostramos que a migração dos monócitos para SNC de animais infectados com vírus ZIKA é dependente da produção de CCL2 produzida no cérebro de animais infectados e da expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5. Uma vez que, animais deficientes para CCR2 (CCR2$^{-/-}$) e CCR5 (CCR5$^{-/-}$) apresentaram uma redução da frequência dos monócitos CD11b^{+}Ly6C^{hi} para o SNC em comparação aos animais C57BL/6 após a infecção.

De maneira geral, nossos dados mostram que os animais C57BL/6 são resistentes à infecção por ZIKV, uma vez que a via de sinalização de IFN do tipo I está envolvida no recrutamento de monócitos inflamatórios para SNC e consequente controle da replicação viral. O desenvolvimento de um modelo experimental de infecção por vírus ZIKV abre perspectivas para o entendimento dos mecanismos de controle da replicação viral e sobre a patogênese da doença.

Palavras chaves: Modelo experimental, Vírus ZIKV e monócitos inflamatórios

Abstract

Silva, Herculano da Silva**. Migration of leukocytes to the central nervous system in experimental infection with ZIKV virus.** Masters dissertation. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Sp 2018, 70 pg

The ZIKA virus belongs to the genus *Flavivirus*, several studies have demonstrated that the infection by this virus is associated with the development of fetal congenital anomalies and neurological diseases, such as microcephaly and Guillan-Barré syndrome. In order to elucidate the immunological mechanisms of the viral replication control and the disease pathogenesis, the study aim was to establish an experimental model of ZIKV infection in immunocompetent animals and investigate the leukocytes migration to the central nervous system during this virus infection.

ZIKV infected C57BL/6 animals demonstrated an increased viral load in the central nervous system (CNS) after 24 hours of infection and a significant reduction after 48 and 72 hours of infection. However, type I INF receptor deficient mice (IFNAR$^{-/-}$) had a high viral load after 48 and 72 hours of infection. Our data demonstrated that IFNAR$^{-/-}$ animals are highly susceptible to infection with 100% mortality during the acute phase of the disease, while C57BL/6 mice are resistant with 100% survival for more than 30 days of infection.

ZIKA infection induced the recruitment of two monocytes subpopulation CD11b^{+}Ly6C^{hi} and CD11b^{+}Ly6C^{lo} to the CNS in a dependent manner of type I INF signaling. C57BL/6 mice showed an increase of monocytes in the CNS after 48 hours of infection, whereas IFNAR$^{-/-}$ mice recruited these cells only after 72 hours of infection. Interestingly, the monocytes recruitment culminated in an increased expression of IL-6 and IL-18 in C57BL/6 mice CNS, while these cytokines expression was not observed in the CNS of IFNAR$^{-/-}$ animals, thus suggesting the importance of type I INF signaling pathway for these cytokines production.

Finally, we have demonstrated that the monocytes migration to the CNS from animals infected with ZIKA virus is dependent of CCL2 production in the brain of infected animals, as well as the expression of the chemokine receptors CCR2 and CCR5. Given that CCR2 (CCR2$^{-/-}$) and CCR5 (CCR5$^{-/-}$) deficient animals demonstrated a frequency reduction of CD11b^{+}Ly6C^{hi} monocytes to the CNS compared to C57BL/6 mice after infection.

Overall, our data demonstrate that C57BL/6 animals are resistant to ZIKV infection, since the type I INF signaling pathway is involved in the inflammatory monocytes recruitment to the CNS and subsequent viral replication control. The development of an experimental model of ZIKV infection open perspectives for the understanding of viral replication control mechanisms and disease pathogenesis.

Key words: Experimental model, ZIKV e inflammatory monocytes

1.INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Epidemiologia da infecção por vírus ZIKV

O vírus ZIKV foi identificado pela primeira vez em macacos, em Uganda em 1947, através de uma rede de pesquisadores que monitorava a febre amarela coordenado pelo Dr. Mahhafy na Floresta ZIKA. (Dick, Kitchen et al. 1952). No entanto, apenas em 1954 que o vírus ZIKV foi associado a uma doença humana, e após cinco décadas sem descrição de novos casos, foram confirmadas 13 infecções em humanos na África e sudeste Asiático (Wikan and Smith 2016).

Em abril de 2007, o vírus ZIKV iniciou sua dispersão para novas regiões geográficas, sendo descrito 49 casos de doença febril aguda na ilha de Yap, na Micronésia (Duffy, Chen et al. 2009). Entre 2013 a 2014, o vírus ZIKV infectou 11% da população na Polinésia Francesa e 1.385 pessoas na Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e Ilha Cook (Ásia).

No começo de 2015, o vírus ZIKV foi identificado no Brasil, provavelmente introduzido durante a copa das confederações que ocorreu em 2013, e causou uma grande epidemia no país (Faria, Azevedo et al. 2016). Além de causar doença febril aguda, o vírus ZIKV também foi associado à doença neurológica em fetos de grávidas infectadas (Calvet, Aguiar et al. 2016).

Um estudo publicado no ano 2016 demonstrou que aproximadamente 1,6 milhões de pessoas foram infectadas com o ZIKV em todo o mundo. A maioria dos casos concentra-se na América do Sul, em especial no Brasil. Na África, estima-se que em Cabo Verde possua cerca de sete mil casos, além de casos espalhados em diversos países (www. Zika vírus infection et al., 2016). Desde o início da epidemia até abril de 2017, o Brasil registrou mais de 180 mil casos de febre de ZIKV e cerca de 13 mil casos suspeitos de microcefalia. O vírus ZIKV continua sua dispersão pelo mundo, já tendo sido descrito em 40 países nas Américas (Liu, Liu et al. 2017; Metsky, Matranga et al. 2017)

De acordo com os estudos de análises filogenéticas existem duas linhagem do vírus, uma de origem africana e outra asiática (Lanciotti, Kosoy et al. 2008; Haddow, Schuh et al. 2012).

1.2 O Vírus ZIKV

O vírus ZIKV é um membro de gênero de *flavivírus*, família *flaviviridae*, que compreende o vírus da Dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite Japonesa (JEV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (Lanciotti, Kosoy et al. 2008; Lazear and Diamond 2016).

O ZIKV é constituído por um genoma de RNA de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 10,7 Kb. De maneira semelhante a outros *flavivírus*, o genoma de ZIKV codifica uma única poliproteína clivada posteriormente em 10 proteínas funcionais distintas, em três proteínas estruturais: proteína de capsídeo (C), proteína pre-membrana (prM) e proteína de envelope (E), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, SN4A, NS4B E NS5. (Chambers, Hahn et al. 1990; Kuno and Chang 2007).

Estas proteínas estruturais são responsáveis por orquestrar a aderência de partículas virais às células e subsequente baixa do pH, que ativam a fusão entre as membranas virais e células-alvo, durante a entrada por endocitose. A proteína C envolve o genoma viral, formando um nucleocapsídeo. A proteína prM age como uma *chaperone* para a proteína E durante a montagem do vírion, e é clivada pela proteína convertase furina em proteína M, que regula a fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro. Enquanto a proteína de envelope (E) medeia a ligação, entrada e fusão celular (Mukhopadhyay, Kuhn et al. 2005). As proteínas não estruturais virais regulam a transcrição e replicação viral e também atenuam as respostas antivirais do hospedeiro (Pierson and Kielian 2013; Diamond and Pierson 2015).

ZIKV é um *Flavivírus* transmitido pelo repasto sanguíneo de um mosquito vetor. Após o repasto sanguíneo, o vírus se liga a superfície celular do hospedeiro através da interação com diversos receptores e/ou fatores de adesão, tais como, glicosaminoglicanos (Chen, Maguire et al. 1997; Prestwood, Prigozhin et al. 2008; Pierson and Kielian 2013; Diamond and Pierson 2015); lectinas de tipo C; receptor de manose dependente de célula dendrítica (DC-SIGN); (Miller, de Wet et al. 2008); receptores de fosfatidilserina, e domínio de mucina (TIM) (Meertens, Carnec et al. 2012); Axl, também foi implicado como receptor de entrada do vírus ZIKV.

Flavivírus, de forma geral, são internalizados pontos da membrana ricos em clatrina e trafegam para o compartimento pré-lisossomal endocítico, onde o pH ácido promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Pierson and Kielian 2013).

Com o genoma viral livre no citoplasma, inicia-se a replicação, que é encaminhada ao retículo endoplasmático rugoso para ser processado e iniciar a síntese de RNA, que consiste em partículas virais imaturas. Posteriormente, o amadurecimento das partículas virais ocorre durante a passagem através das vesículas do complexo de Golgi, onde é feita a glicosilação da glicoproteina-E e a prM é clivada, resultando na formação de partículas maduras, isto é, infecciosas. Por fim, estas são liberadas da célula através da exocitose (Lindenbach et al., 2007).()

O ciclo biológico de transmissão de vírus ZIKV envolve a participação de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado, sendo que o ciclo no invertebrado ocorre no inseto vetor, *Aedes Aegypti, Aedes Albopictus*, que são competentes para transmissão; (Dick, Kitchen et al. 1952; Marchette, Garcia et al. 1969; Hayes 2009; Li, Wong et al. 2012; Diallo, Sall et al. 2014; Ledermann, Guillaumot et al. 2014). O *Aedes aegypti* foi considerado o principal vetor de propagação de ZIKV durante o surto na América Latina e no Caribe, provavelmente devido à abundância urbana e natureza antropofílica deste mosquito (Powell and Tabachnick 2013).

Embora o vetor represente a principal forma de transmissão do vírus ZIKV, outras formas de transmissão foram relatadas. Por exemplo, o ZIKA também pode ser transmitido entre os humanos por via sexual e pode ser responsável por aproximadamente 3% dos casos humanos, uma vez que o vírus foi detectado no sêmen de homens infectados, a transmissão do sexo feminino para o sexo masculino também ocorre (Barzon, Pacenti et al. 2016; Mansuy, Pasquier et al. 2016). Além disso, pode ser transmitido pela transfusão de sangue, transplante de órgãos e potencialmente pelo contato com urina, saliva ou fluídos conjuntivais (Barzon, Pacenti et al. 2016; Swaminathan, Schlaberg et al. 2016).

A patogênese do vírus da ZIKV no organismo humano ainda é pouco compreendida. Após o repasto do *Aedes aegypti* infectado, as partículas virais penetram através das múltiplas camadas de barreira do hospedeiro seguindo

para os linfonodos drenantes e, subsequentemente, atingindo a circulação sanguínea causando viremia. O vírus da ZIKV possui tropismo por diversos órgãos, tais como o sistema nervoso central, proporcionando a complicações neurológicas, particularmente a síndrome de Guillain-Barre, e casos de microcefalia fetais (Mlakar, Korva et al. 2016); (Oehler, Watrin et al. 2014).

Aproximadamente 80% dos indivíduos infectados com ZIKV são assintomáticos, dificultando assim o diagnóstico da doença. Dessa forma, uma minoria dos indivíduos infectados pode apresentar manifestações clínicas leves, tais como: febre, erupção cutânea, macula papular e conjuntivite. Alterações neurológicas graves também podem se desenvolver, incluindo a síndrome de Guillain-Barré e meningoencefalite (Carteaux, Maquart et al. 2016).

A confirmação laboratorial da infecção pelo vírus da ZIKV é crucial, uma vez que o amplo espectro de apresentações clínicas e a semelhança de sinais e sintomas com outros arbovírus co-circulantes tais como, dengue e chikungunya, tornam o diagnóstico clínico preciso inviável. Atualmente, os métodos de diagnóstico da ZIKV compreendem a detecção do material genético viral (RNA) (Musso, Roche et al. 2015), de antígenos virais (ex: NS1), anticorpos através do ensaio de ELISA (IgM ou IgG) e imunoflurescência realizada a partir de 5 ou 6 dias após início de sintomas (ECDC et al., 2015).

Atualmente não existem vacinas ou tratamentos contra o ZIKA. Geralmente recomendam-se métodos paliativos para os pacientes, tais como descanso e hidratação (ECDC et al., 2015; CDC et al., 2016). A infecção em mulheres grávidas é de grande preocupação, uma vez que podem estar relacionados a anomalias fetais como a microcefalia, aborto espontâneo e restrição do crescimento intrauterino (CIUR), devido à insuficiência placentária (Brasil, Pereira et al. 2016).

Devido a crescente preocupação com a saúde pública, existe uma urgente necessidade de estabelecer modelos animais de infecção intrauterina para ZIKV, assim como modelo murino para estudar a patogênese da doença, com o objetivo de auxiliar na identificação dos mecanismos de transmissão fetal, na compreensão dos mecanismos imunológicos para o controle da doença, e facilitar os testes para o desenvolvimento de terapias e vacinas.

1.3 Resposta Imune antiviral

Acredita-se que o vírus inicialmente se multiplica em macrófagos e células dendríticas, estas circulam para os gânglios linfáticos drenantes e outros tecidos linfoides. Após um período de viremia, os vírus se espalham para monócitos, macrófagos ou células dendríticas em múltiplos tecidos. Em um curto período de infecção com vírus ZIKV, ocorre o aparecimento de manifestações clínicas, como febre, através de liberação de mediadores inflamatórios (Bowen, Quicke et al. 2017). A resposta imune contra vírus ZIKV é mediada pela produção de interferons, principais mecanismos antivirais, que compreende interferon de tipo I (IFN-α, β) (van den Broek, Muller et al. 1995). interferon de tipo III (IFN-λ1-4) (van den Broek, Muller et al. 1995),

Os interferon de tipo I são codificados por uma família de genes IFNα, e um gene IFN-β; O interferon de tipo II é codificado por um gene IFN-γ; e o interferon de tipo III, IFN-γ1-4, também são conhecidos como IL-29, 28A-C. Os interferons são produzidos pela maioria das células nucleadas. Após o reconhecimento de vírus por receptores de reconhecimento de padrões celulares (PRRs) tais como gene induzível por ácido retinoico I (RIG-I), e os receptores tipo Toll (TLRs 3 e 7), bem como pelo antígeno de diferenciação de melanoma 5 (MDA5) localizados no citosol de quase todas as células do corpo são capazes de reconhecer o RNA viral (Loo and Gale 2011).

O vírus de RNA se replica no citosol são reconhecidos principalmente por RIG-I e MDA5. Ao se ligarem, RIG-I e MDA5 sofrem modificações pós-traducionais, incluindo desfosforilação e ubiquitinação, que tornam ativos a sua capacidade de interação com a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) (Gack, Shin et al. 2007; Wies, Wang et al. 2013). MAVS, então, desencadeia a ativação das quinases não canônicas relacionadas com IKK e TBK1 (Zevini, Olagnier et al. 2017). O engajamento desses PRRs por ácidos nucleicos virais resulta na ativação de fatores de transcrição múltiplos, incluindo fatores reguladores de interferon (IRFs) e NF-kB, que juntamente cooperam na indução de interferon e na produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas que orquestram as respostas imunes inatas e adaptativas (Ngono e Shresta, 2018).

A atividade biológica dos interferon de tipo I é mediada por meio da sinalização via receptor de interferon tipo I (IFNAR) (Schneider, Chevillotte et al. 2014), um heterodímero que consiste em cadeias IFNAR1 e IFNAR2, que é sinalizado através de sinais traduzido pela janus kinase e a via de ativação da transcrição de STATs. A JAK1 e TYK2 fosforilam e ativam STAT1 e STAT2 seguindo a heterodimerização de STAT1 e STAT2 e associação ao DNA de outra proteína de ligação, o fator regulador do interferon 9 (IRF-9), para formar o fator gênico estimulado por interferon 3 (ISGF-3). O complexo ISGF-3 promove a expressão de genes dependentes de interferon do tipo I ao se ligar ao ISRE (elementos estimuladores de resposta interferon) (Schneider, Chevillotte et al. 2014).

Esses ISGs influenciam muitos processos celulares, incluindo processamento de RNA, estabilidade de proteínas e viabilidade celular, afetando diretamente as etapas específicas do ciclo viral e, portanto, a replicação do vírus. Os ISGs em células que apresentam antígenos, como macrófagos e células dendríticas são importantes para a ativação de células T e B, afetando assim a magnitude e a qualidade da resposta imune adaptativa e o eventual eliminação do vírus (Schneider, Chevillotte et al. 2014).

A infecção com vírus ZIKV de origem africana e asiática é capaz de induzir respostas imunes humorais amplamente neutralizantes e protetoras (Dowd, DeMaso et al. 2016). Curiosamente, os anticorpos contra DENV reagem de forma cruzada com ZIKV, mas exibem atividade de neutralização limitada. Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* sugerem que esses anticorpos produzidos por uma infecção prévia com DENV são incapazes de neutralizar uma infecção secundária por ZIKV, além de exacerbar a infecção, fenômeno denominado *Antibody Dependent Enhancement* (ADE) (Priyamvada, Quicke et al. 2016; Andrade and Harris 2017; Bardina, Bunduc et al. 2017).

No entanto, o impacto de anticorpos reativos cruzados sobre a patogênese da ZIKV em humanos ainda é obscuro. Uma melhor compreensão da relevância *in vivo* da ADE durante a infecção por ZIKV de um indivíduo com exposição prévia a outro *flavivírus*, seja por infecção natural ou vacinação, é de importância significativa para os atuais esforços no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra DENV e ZIKV.

A imunidade das células T $CD8^+$ parece ser importante durante a infecção por ZIKV. Na fase aguda, as células T $CD8^+$ específicas para ZIKV se expandem, são funcionais e exibem citotoxicidade *in vivo* (Elong Ngono, Vizcarra et al. 2017). Em um modelo de primata não humano, utilizando macacos *rhesus* infectados por ZIKV foi demonstrado que as células T $CD8^+$ iniciam a proliferação a partir de 6 dias após a infecção (dpi), atingindo um pico de proliferação entre os dias 8 e 9 dpi. Aos 14 dpi já é possível observar uma contração da resposta (Hirsch, Smith et al. 2017).

Em modelo experimental de infecção por vírus ZIKV, as células T $CD8^+$ comprometem a replicação viral em tecidos periféricos e no sistema nervoso central. Camundongos *knockout* de células T $CD8^+$ são extremamente suscetíveis à infecção pelo ZIKV. Notavelmente, a transferência prévia de células T $CD8^+$ isoladas de camundongos infectados com ZIKV para camundongos posteriormente infectados promove o controle da replicação viral.

Apesar da resposta de células T CD8 desempenhar um importante papel protetor no controle da replicação viral, no entanto uma resposta exacerbada pode ser deletéria para o hospedeiro. Em neonatos infectados com vírus ZIKV foi encontrado um grande número de células T $CD8^+$ no SNC que contribuem para a neurodegeneração (Manangeeswaran, Ireland et al. 2016).

De maneira interessante, foi demonstrado em modelo murino que as células T $CD8^+$ específicas para DENV podem controlar a replicação do vírus ZIKA (Wen, Tang et al. 2017), indicando que a geração de uma resposta de células T $CD8^+$ protetora, tem implicações importantes para o desenvolvimento de vacinas contra múltiplos *flavivírus*.

1.4 Modelos experimentais de infecção por ZIKA vírus

Utilizando modelo experimental de infecção com vírus ZIKV de origem asiática isolado no Brasil, mais especificamente no Instituto Evandro Chagas em Belém do Pará (BeH819966) foi possível demonstrar que o vírus é capaz de invadir a placenta infectando o feto e causando deformidades após o nascimento (Brasil, Calvet et al. 2016) (Brasil, Pereira et al. 2016). Além disso, filhotes de camundongos fêmeas SJL infectadas com o vírus (ZIKVBR)

apresentaram atraso no desenvolvimento quando comparados com os filhotes nascidos a partir de camundongos controles. De maneira curiosa, o vírus foi detectado em grande quantidade no sistema nervoso central, podendo ser detectado em vários tecidos de animais recém-nascidos, confirmando assim a natureza neurotrópica do vírus (Brasil, Pereira et al. 2016).

No entanto, outras cepas do vírus ZIKV de origem africana como Dakar 41519, Dakar 41.667, Dakar 41671 e H/PF/2013 quando inoculadas em camundongos geneticamente deficientes do receptor de IFN tipo I desenvolveram sintomas neurológicos e sucumbiram à infecção com alta carga viral em diversos tecidos (cérebro, medula espinhal e testículos) de maneira semelhante ao que ocorre na infecção em humanos. Além disso, camundongos pré-tratados com anticorpos neutralizantes contra IFN-tipo I e infectados com ZIKV vírus apresentaram uma alta carga viral, demonstrando a importância da via de sinalização de IFN do tipo I para o controle da infecção viral.

A resposta imune contra o vírus ZIKV acontece em duas etapas distintas: a fase aguda e crônica. Na fase aguda observa-se um aumento na produção de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, bem como por IFN-γ (Tappe, Perez-Giron et al. 2016). Os linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e NK também têm sido implicados no controle inicial dos vírus, por meio de mecanismos efetores mediados por IFNs de tipo I.

Na fase crônica, observam-se baixos níveis de viremia até a eliminação do vírus (Haddow, Schuh et al. 2012). Anticorpos específicos contra o ZIKA são capazes de impedir o vírus de infectar células (Blaney, Matro et al. 2005; Whitehead, Blaney et al. 2007; Zhang, Yan et al. 2007; Roehrig, Hombach et al. 2008; Guzman, Halstead et al. 2010; Chiang, Huang et al. 2012) por meio do bloqueio da ligação de partículas virais impedimento a alteração conformacional das proteínas de fusão das membranas nos endossomos (Lok, Kostyuchenko et al. 2008; Cockburn, Navarro Sanchez et al. 2012; Pierson and Kuhn 2012).

1.5 Papel dos monócitos na resposta imune antiviral

Os monócitos são populações de células heterogêneas derivadas da medula óssea que são recrutadas para locais de infecção e inflamação em muitos modelos de doenças humanas(Serbina, Jia et al. 2008). São divididos em duas populações principais fenotipicamente e funcionalmente distintos: $CX3CR1^{low}CCR2^{+}Ly6C^{hi}$ e $CX3CR1^{hi}$ $CCR2^{low}Ly6C^{low}$ (Dunay, Damatta et al. 2008), (Geissmann, Jung et al. 2003). As células $LY6C^{hi}$ foram denominadas monócitos inflamatórios porque são seletivamente recrutadas para locais de inflamação e infecções (Woollard and Geissmann 2010); (Swirski, Libby et al. 2007)) virais, bacterianas, fúngicas e por protozoários (Serbina, Shi et al. 2012). Os monócitos $CX3CR1^{hi}$ $CCR2^{low}Ly6C^{low}$ patrulham o lúmem dos vasos sanguíneos em condição de homeostase (Auffray, Fogg et al. 2007).

Em condição de inflamação ou infecção, essas células podem entrar rapidamente no tecido e contribuir para a geração de respostas inflamatórias precoces antes mesmo da migração dos monócitos inflamatórios $Ly6C^{hi}$ (Auffray, Fogg et al. 2007). Além disso, essas células desempenham um importante papel no reparo tecidual auxiliando processos de cicatrização de feridas e angiogênese (Auffray, Fogg et al. 2009).

Após a migração dos monócitos inflamatórios $Ly6C^{hi}$ no sítio da infecção, essas se diferenciam em células dendríticas (DC) ou em macrófagos. Uma vez diferenciadas, essas células desempenham várias funções incluindo apresentação de antígenos, estimulação de células T e a produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios, bem como espécies reativas de oxigênio. No entanto, a migração exacerbada de monócitos para o sítio de infecção pode ser deletério para o hospedeiro causando dano e destruição tecidual.

Baseado no que foi exposto, o objetivo geral do trabalho foi estabelecer um modelo experimental de infecção por vírus ZIKV em animais imunocompetentes e investigar a migração de leucócitos para o sistema nervoso central durante a infecção, bem como a elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle de replicação viral e na patogênese da doença. A compreensão dos mecanismos de controle viral e da patogênese da doença abre perspectivas para o desenvolvimento de terapias e vacinas para o combate da doença.

2.OBJETIVOS

2.OBJETIVO GERAL

Investigar a migração de leucócitos para o sistema nervoso central (SNC) durante a infecção experimental por vírus ZIKV.

2.2 Objetivos específicos

2.1.1 Padronização do modelo experimental do vírus ZIKV em animais imunocompetentes;

2.1.2 Avaliar as populações de leucócitos presentes no SNC durante a infecção por vírus ZIKV;

2.1.3 Avaliar a expressão de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas induzido durante a infecção por vírus ZIKV;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os camundongos isogênicos C57BL/6, deficientes para o receptor do IFN do tipo I (IFNAR$^{-/-}$) e 129SV com 3 semanas de idade foram obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP e mantidos durante o período experimental no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia desta Faculdade. Os experimentos foram realizados utilizando de 3 a 5 camundongos por grupo. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética para animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP (152/2017)

3.2 Propagação e titulação do vírus ZIKV *in vitro*

O vírus ZIKV foi obtido a partir de um isolado de paciente em Belém de Pará (BEH819966) no Instituto Evandro Chagas, as células Vero foram infectadas com vírus 50µL ZIKV cultivadas a 37ºC em meio DMEM (GIBCO) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (GIBCO). As células foram cultivadas por um período de 3 dias. A presença de infecção celular (90-100%) através da avaliação do efeito citopático (CPE) na célula Vero. Após a avaliação da infecção, foi realizada a centrifugação (3000g, 5 minutos, 4°C) para lise das células e obtenção do vírus presente no sobrenadante. O vírus foi então aliquotados em eppendorfs de 1,5mL em freezer à -70°C.

Para a titulação viral, células Vero ($4x10^5$ células/poço) foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% SFB em placas de 24 poços, 37°C, até atingir confluência de 70-80% da células. Uma amostra do estoque viral foi diluída, de forma seriada, e adicionada às células. Após 1 hora de incubação, com agitação a cada 10 minutos, as monocamadas foram lavadas com DMEM sem SFB e cobertas com uma camada de carboximetilcelulose a 3%. As placas foram incubadas por sete dias a 37°C, e posteriormente lavadas e coradas com cristal violeta 1% para determinação do número de unidades de placa formadas (PFU) por ml. O estoque viral é de $1x10^6$ PFU

3.3 Modelo experimental de infecção

Os camundongos foram infectados pela via intraperitoneal com $1x10^5$ PFU vírus ZIKV e monitorados diariamente por 30 dias para avaliar a sobrevida e a perda de peso corporal. Após 12, 24, 48 e 72 horas de infecção avaliamos carga viral no cérebro dos animais por qPCR. Após 48 e 72 horas de infecção isolamos e caracterizamos os leucócitos presentes no SNC por citometria de fluxo, bem como a expressão de quimiocinas e citocinas por qPCR e/ou Imunohistoquímica.

3.4 Isolamento de leucócitos do SNC

Para o isolamento das células do SNC, primeiramente foi realizado perfusão dos animais com 20 ml de PBS, e, em seguida, o cérebro foi coletado e cortado em pedaços pequenos na presença de meio Hanks 1X. A suspensão celular foi filtrada em *cell strainer* e lavada com meio Hanks 1X. Após esse período, as células foram submetidas ao gradiente de Percoll 70/30% centrifugado a 1250xg . Após esse período, a interface contendo os leucócitos foram coletadas e lavadas em PBS. E por fim, a viabilidade celular foi determinada por Azul de Tripan.

3.5 Citometria de fluxo

Para a realização da caracterização dos leucócitos isolados do SNC, primeiramente foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de FC Block 1:1 por 30 minutos a 4ºC. Após decorrido essa etapa de incubação, as células foram marcadas com os seguintes anticorpos de superfície CD45 (30-F11), CD11b (M1/70), CCR2 (5538P) e Ly6C (AL-12) marcados com fluorocromos (FITC, PE, Percp, APC-Cy7 e Pacific blue) por 30 minutos a 4ºC. Todos os anticorpos utilizados foram da Biolegend. Finalmente, as células foram lavadas em PBS e a aquisição das amostras foi realizada no citômetro

de fluxo FACSCanto II e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo.

3.6 Extração de RNA

Amostras de tecido de cérebro foram armazenadas à -70ºC em Trizol® (Life Tecnologies, Gaithersburg, MD, EUA) até o momento da extração do RNA total. O tecido foi homogeneizado com o auxílio de uma haste de trituração autoclavada e tratada com dimetilpirocarbonato (DEPC) para a eliminação de RNase. À mistura foram adicionados 500 µl de Trizol e 200 µl de clorofórmio. Após a centrifugação (12000 x g, 15 minutos, 4°C), a fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida para outro tubo com 200 µl de etanol 95% e purificada através do *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, EUA) conforme instruções do fabricante. O RNA das amostras foi quantificado por leitura em NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) à 260 nm de absorbância (A_{260}) e logo em seguida, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.7 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. Em resumo, 500 ng de RNA foram adicionados à 5 µl do mix (2 µl de tampão Buffer (10x), 1 µl de dNTPs a 10 mM, 1 µl de Oligo dT, 1 ul Reverse Transcriptase a 50 U/ul e 0,2 µl de água Milliq-Q estéril) foram acrescentados às amostras, as quais foram mantidas à 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, 85°C por 5 minutos e 10 °C pelo menos 1 minuto em Termociclador (Modelo PTC-100, MJ Research, Watertown, MA, EUA). Posteriormente, a solução foi diluída 8 vezes com água Milli-Q estéril e armazenada à -20°C até o momento do uso.

3.8 Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

A expressão relativa de genes foi analisada por meio das reações de qPCR, utilizando-se o sistema de intercalante e o aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). Esse sistema (StepOne Software v2.2.2) realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras através da utilização de nucleases fluorogênicas, sendo a expressão normalizada com base em controle endógeno (gene de referência) (gene Hprt, do inglês, hypoxanthine phosphoribosyltransferase). Iniciadores adequados para tais reações, também conhecidos por *primers*, foram criados a partir do programa Primers Express (Applied Biosystems). As sequências utilizadas neste trabalho estão listadas na Em resumo, o cDNA de cada amostra (5 µl) foi adicionado à 7,65 µl de GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega), 0,5 µl do primer sense (1-2 µg/ reação), 0,5 µl do primer antisense (1-2 µg/reação) e 1,35 µl de água Milliq-Q estéril. A amplificação das sequências dos genes alvo e controle interno (Hprt) foi avaliada através da curva exponencial de amplificação após incubação a 10 minutos a 95˚C, 40 ciclos de 15 segundos a 95˚C e 30 segundos a 58˚C, um ciclo de 72˚C por 30 segundos e uma etapa final com 95˚C por 15 segundos e temperaturas crescentes de 60 a 95ºC para a obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação. Os resultados foram analisados com base no valor da linha de corte Ct (*cycle threshold*), definido após o término da reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar, que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Os cálculos para a determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados de acordo com as instruções contidas no folheto *User's Bulletin* (P/N 4303859, Applied Biosystems). Os valores de ΔCt para cada uma das amostras avaliadas foram calculados da seguinte maneira: ΔCt = CT gene interesse – CT gene referência (Hprt). A expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) amostral em relação ao grupo controle foi calculada através da fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, sendo que $\Delta\Delta$Ct = ΔCt amostra - ΔCt controle.

3.9 Quantificação da carga viral

A quantificação da carga viral foi analisada através de reações de PCR em tempo real (qPCR), através do sistema TaqMan™, QuantiNova™ Probe RT-PCR Kit, e o aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). Esse protocolo é optimizado para quantificação de alvos de RNA utilizando sondas TaqMan™ em uma reação *singleplex.* Os *primers*, tanto da sequência viral e da sonda, foram criados a partir do programa Primers Express (Applied Biosystems). As sequências utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela C (Apêndice C). Para quantificação relativa do vírus foi utilizada uma curva padrão de uma diluição seriada do vírus ZIKV de estoque. Em resumo, o RNA de cada amostra (2,5 µl) foi adicionado à 5 µl de 2x Probe RT-PCR Master Mix, 0,5 µl do QN ROX (fluoróforo de referência), 0,1 µl QN Probe RT-Mix, 0,5 µl do primer sense (F), 0,5 µl do primer antisense (R), 0,5 µl do primer sonda (P) e 0,4 µl de água nuclease free. A amplificação das sequências virais foi avaliada através da curva relativa do ZIKV de amplificação após incubação a 10 minutos a 45˚C, um ciclo de 5 minutos a 95˚C, 45 ciclos de 5 segundos a 95˚C e 30 segundos de 60˚C por 30 segundos.

ZIKV probe5' AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA3'
ZIKA F 5' CCGCTGCCCAACACAAU3'
ZIKV R 5' CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT3'

3.10 Imuno-histoquímica

Amostras de tecido do cérebro foram congeladas em meio de congelamento Tissue Tek® (Sakura Finetek Inc., Torance, CA, EUA) e mantidas a -70ºC para realização de reações de imuno-histoquímica (peroxidase). Com o auxílio de um criostato foram obtidos cortes com 5 µm de espessura e, em seguida, os cortes foram fixados com acetona 100% por 10 minutos a -20°C. A peroxidase endógena do tecido foi bloqueada por meio da

incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por três vezes com PBS e incubadas com PBS 1% BSA (Sigma) por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos primários em PBS/saponina 0,01% (Sigma) para marcações intracelulares, anti-CCL2, (ThermoFisher CCL2 PA5-34505, Rabbit anti-Human, Mouse e Rat anticorpo policlonal) durante 18 horas à 4°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos secundários biotinilados (adicionar marca). Após novas lavagens, foi adicionado o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido os minutos de incubação, os cortes foram lavados com PBS e revelados com substrato revelador 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Zymed Laboratories Inc., CA, EUA). Para a marcação de CCL2, utilizamos o Kit MACH 1 UNIVERSAL HRP-POLYMER, seguindo recomendação de fabricante. As lâminas com os cortes foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer e, então, montadas com Bálsamo do Canadá. A análise foi realizada em microscópio óptico comum acoplado a uma câmara digital (Olympus).

3.11 Análises estatísticas:

foram utilizados a análise de variância (ANOVA) e o pós teste de Bonferroni para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais, considerando $P < 0,05$. Os testes foram realizados pelo *softwarePrism 5.0* (Graphpad).

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Os animais C57BL/6 são resistentes a infecção por ZIKV

Primeiramente, estabelecemos um modelo experimental de infecção com ZIKV vírus (ZIKV) com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais o esse vírus induz uma resposta imunológica, com a participação de células da imunidade inata, em especial, dos monócitos inflamatórios durante o desenvolvimento da doença. Para isso, os camundongos da linhagem selvagem C57BL/6, 129SV e deficientes do receptor da citocina do IFN do tipo I ($IFNAR^{-/-}$) com 3-4 semanas de vida foram infectados pela via intraperitoneal com $1x10^5$ PFU ZIKV, cepa de origem asiática, isolada em Pernambuco (nordeste do Brasil) e a sobrevida e perda de peso dos animais foram avaliados diariamente.

Os animais $IFNAR^{-/-}$ infectados perderam peso durante os primeiros dias de infecção, enquanto os animais C57BL/6 e 129SV mantiveram ou até mesmo ganharam peso após infecção (Figura 1A). A perda de peso dos animais $IFNAR^{-/-}$ foi acompanhada de 100% de mortalidade por volta do 9° ao 10° dia após infecção, enquanto que os animais C57BL/6 e 129SV apresentaram 100% de sobrevida por mais de 30 dias após a infecção (Figura 1 B).

Em seguida, avaliamos a carga viral no SNC durante o curso inicial de infecção. A partir de 12 horas de infecção já foi possível detectar cópias de RNA no SNC dos animais C57BL/6 com um pico de expressão 24 horas após a infecção (Figura 1C). Como esperado, os animais $IFNAR^{-/-}$ apresentaram uma alta carga viral no SNC após 48 e 72 horas após infecção (Figura 1D). Esses resultados iniciais sugerem que os animais da linhagem C57BL/6 são resistentes à infecção por ZIKV.

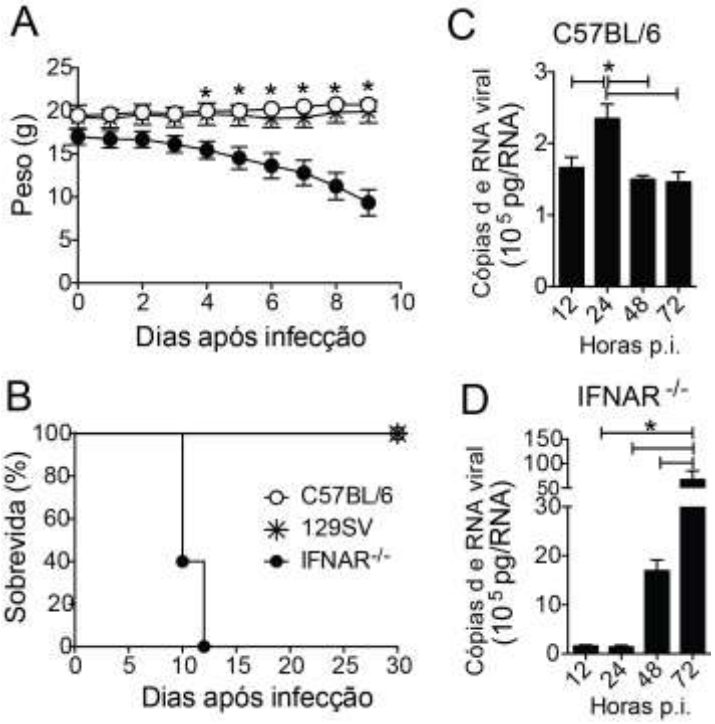

Figura 1. Modelo experimental de infecção por ZIKV. Os camundongos C57BL/6, 129SV e IFNAR$^{-/-}$ (3 semanas) foram infectados com 1x10^5 PFU de vírus ZIKA (ZIKV) pela via intraperitoneal e alguns parâmetros como (A) perda de peso e a (B) sobrevida dos animais foram avaliados diariamente. Após 12, 24, 48 e 72 horas de infecção um fragmento do SNC dos animais (C) C57BL/6 e (D) IFNAR$^{-/-}$ foi coletado para extração de RNA e a quantificação da carga viral por qPCR. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

4.2. A Infecção por ZIKV modula a produção do IFN de tipo I no SNC

Visto que o IFNAR é importante para controlar a replicação viral no SNC de animais experimentalmente infectados com ZIKV. Avaliamos a cinética da expressão das citocinas IFN-α e IFN-β, bem como do IFNAR no SNC de animais WT infectados. Para isso, os camundongos da linhagem selvagem C57BL/6 com 3-4 semanas de vida foram infectados pela via intraperitoneal com $1x10^5$ PFU ZIKV. Após 0, 24, 48 e 72 horas da infecção, o mRNA para *ifn-α*, *ifn-β* e *ifnar* foi avaliado por PCR quantitativo.

Os dados demonstram que a infecção por ZIKV induz a expressão da citocinas *ifn-α* (Figura 2A) e *ifn-β* (Figura 2B) no SNC, com pico da expressão com 48h após a infecção quando comparado aos animais não infectados. Foi observada um discreto aumento da expressão de *ifnar* com 72h após a infecção (Figura 2C).

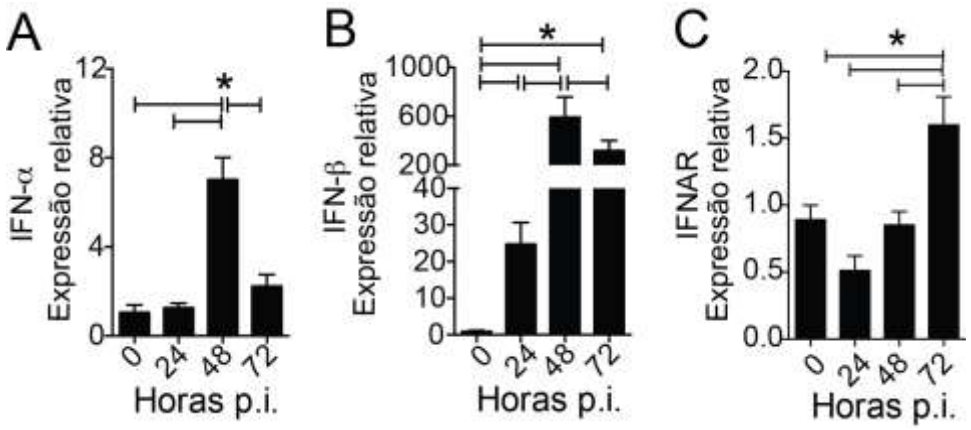

Figura 2. Expressão de IFN tipo I e do seu receptor no SNC de animais infectados por ZIKV. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV e após 24, 48 e 72 horas de infecção, um fragmento do SNC foi coletado para extração de RNA. A expressão relativa de (A) IFN-α, (B) IFN-β e (C) IFNAR foram determinados por qPCR. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

4.3. Infecção experimental pelo ZIKV induz o recrutamento de leucócitos para o SNC

A infecção com vírus ZIKV está associada com ativação de células residentes e recrutamento de leucócitos para o SNC.

Com intuito de avaliar se a presença do vírus estava induzindo o recrutamento de leucócitos para o SNC. A nossa próxima etapa foi avaliar as populações de leucócitos presentes no SNC durante a infecção por vírus ZIKV. Para isso, células do SNC de camundongos C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ infectados após 48 e 72 horas foram isoladas e quantificadas por citometria de fluxo quanto a expressão de CD45 e CD11b. Primeiramente, avaliamos a frequência e o número absoluto das populações de leucócitos e de micróglias. Nos animais C57BL/6 apesar de não apresentarem diferença significativa na frequência de leucócitos (CD11b^{+}CD45^{hi}) no SNC durante a infecção por ZIKV, foi possível observar um aumento significativo do número absoluto de leucócitos 48 horas após-infecção comparados com os animais controles (não infectados) (Figura 3A e B). Em relação as células residentes (micróglia) (CD11b^{+}CD45^{lo}), a frequência e o número absoluto foram similares entre os diferentes dias de infecção avaliados no SNC de animais C57BL/6 (Figura 3A e C). Relativo aos animais IFNAR$^{-/-}$, observamos que a infecção induziu o aumento significativo na frequência e número absoluto de células inflamatórias (CD11b^{+}CD45^{hi}) no SNC numa fase mais tardia da infecção com 72h (Figura 4).

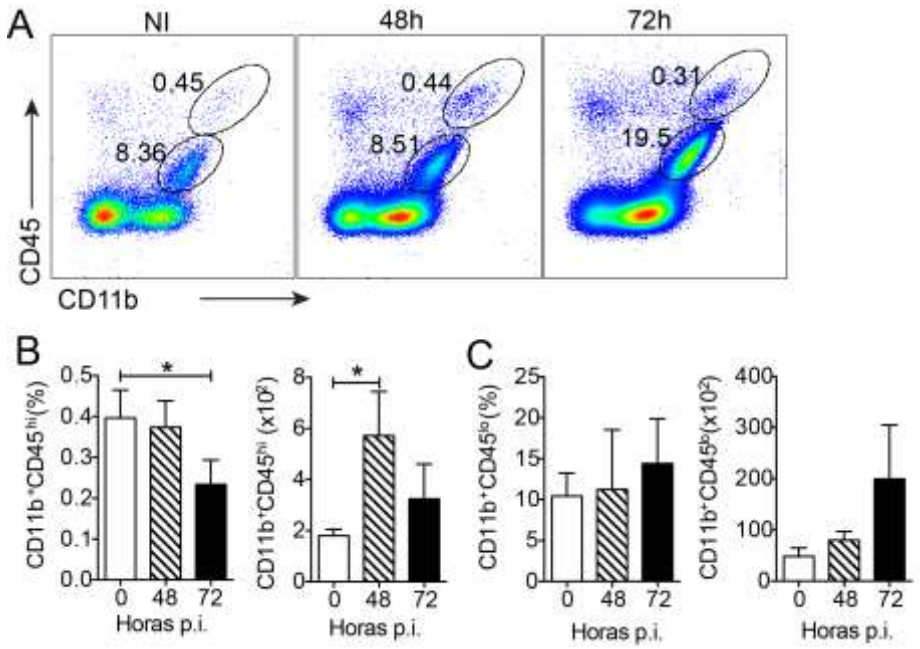

Figura 3. Quantificação de leucócitos e micróglia no SNC de animais C57BL/6 após a infecção por ZIKV. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV e após 48 e 72 horas de infecção, os leucócitos e a micróglia isolados do SNC foram quantificados por citometria de fluxo quanto a expressão de CD11b e CD45. (A) *Dot plot* representativo da frequência de células inflamatórias ($CD11b^{+}CD45^{hi}$) e de micróglia ($CD11b^{+}CD45^{lo}$) presentes no SNC. (B) A frequência e o número absoluto de células inflamatórias ($CD11b^{+}CD45^{hi}$) e de (C) de micróglia em diferentes tempos após a infecção. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo. (* $P < 0.05$).

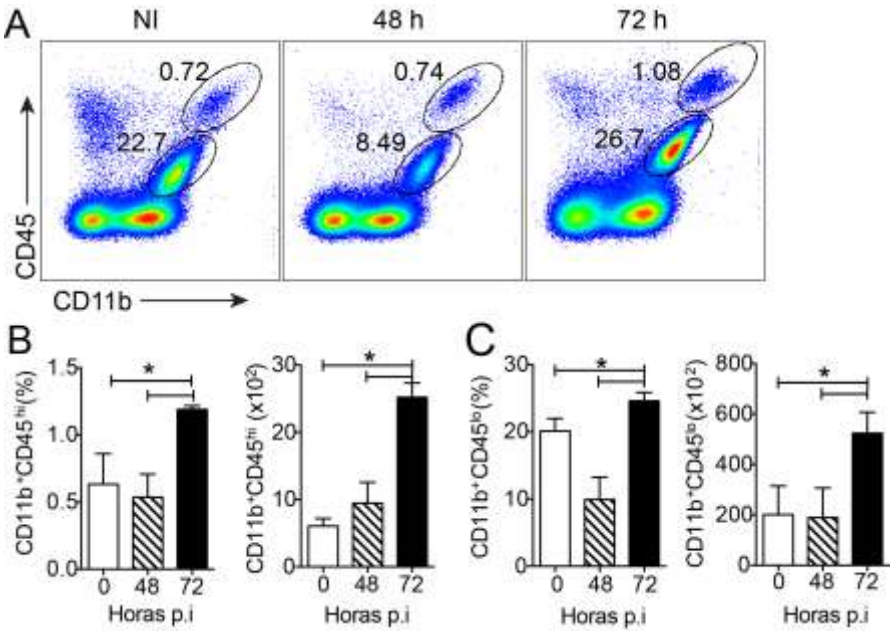

Figura 4. Quantificação de leucócitos e micróglia no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ após a infecção por ZIKV. Camundongos IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV e após 48 e 72 horas de infecção, os leucócitos e a micróglia isolados do SNC foram quantificados por citometria de fluxo quanto a expressão de CD11b e CD45. (A) *Dot plot* representativo da frequência de células inflamatórias (CD11b^{+}CD45^{hi}) e de micróglia (CD11b^{+}CD45^{lo}) presentes no SNC. (B) A frequência e o número absoluto de células inflamatórias (CD11b^{+}CD45^{hi}) e de (C) de micróglia em diferentes tempos após a infecção. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo. (* $P < 0.05$).

4.4. Recrutamento de monócitos para o SNC durante a infecção pelo ZIKV é dependente da sinalização de IFNAR

Com intuito de caracterizar as subpopulações de monócitos presentes no SNC durante a infecção com vírus ZIKV, células do SNC de camundongos C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ infectados após 48 e 72 horas foram isoladas e caracterizadas por citometria de fluxo segundo a expressão de CD11b e Ly6C.

Os resultados demonstram a presença de três subtipos de população de monócitos: CD11b^{+}Ly6C^{hi}, CD11b^{+}Ly6C^{lo} e CD11b^{+}Ly6C^{neg} no SNC dos grupos C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ infectados (Figura 5 e Figura 6). Houve um aumento expressivo no número de monócitos Lyc6^{hi} e Lyc6^{lo} no cérebro dos animais C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ após a infecção com o vírus ZIKA, com o pico do número absoluto de monócitos com 48h e 72h, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência e número absoluto de monócitos Ly6C^{neg} no SNC dos animais infectados com vírus ZIKA (Figura 5 e Figura 6).

Em conjunto, os dados demonstram que a infecção com o vírus ZIKA induz o recrutamento de monócitos Ly6C^{hi} e Ly6C^{lo} para o SNC com 48h após a infecção de maneira dependente da sinalização de IFNAR.

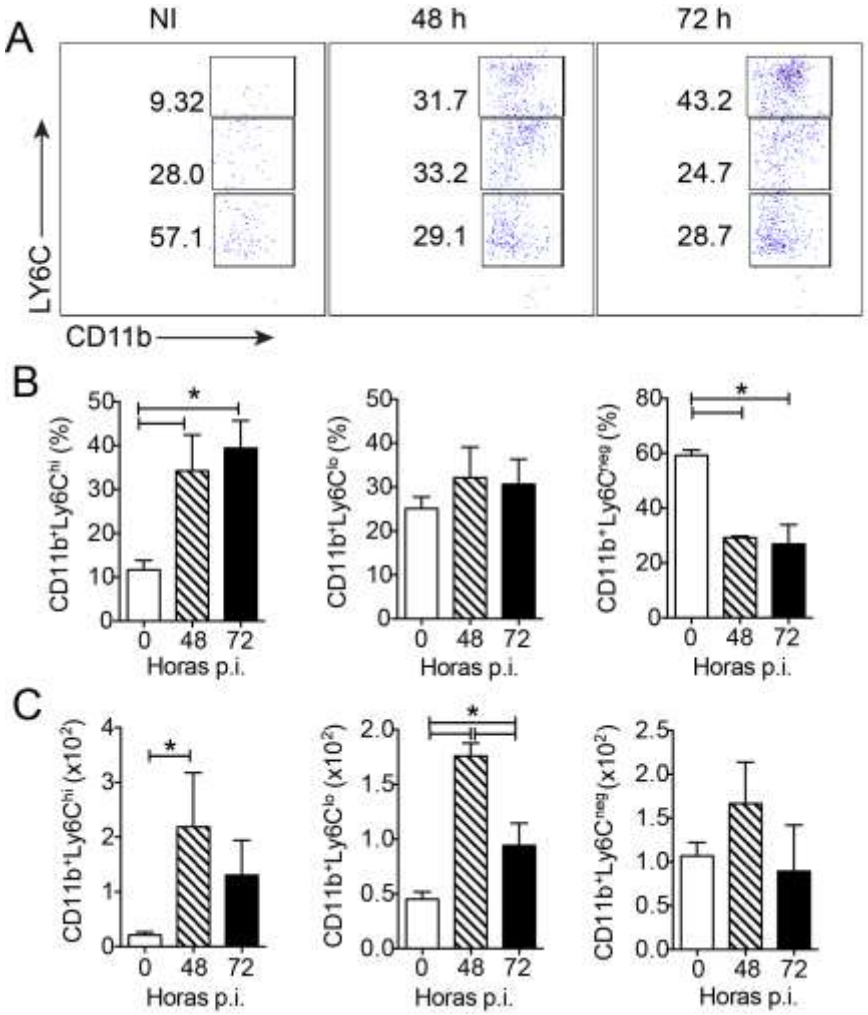

Figura 5. Caracterização de monócitos inflamatórios presentes no SNC de animais C57BL/6 após a infecção por ZIKV. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV e após 48 e 72 horas, os leucócitos isolados do SNC foram caracterizadas quanto a expressão de CD11b e Ly6C por citometria de fluxo. (A) *Dot plot* representativo da frequência de monócitos inflamatórios $CD11b^{+}Ly6C^{hi}$, $CD11b^{+}Ly6C^{lo}$, $CD11b^{+}Ly6C^{neg}$ em diferentes tempos de infecção avaliados na população de células inflamatórias $CD11b^{+}CD45^{hi}$. (B e C) A frequência e o número absoluto das 3 subpopulações de monócitos citados acima presentes no SNC após a infecção com vírus ZIKA. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

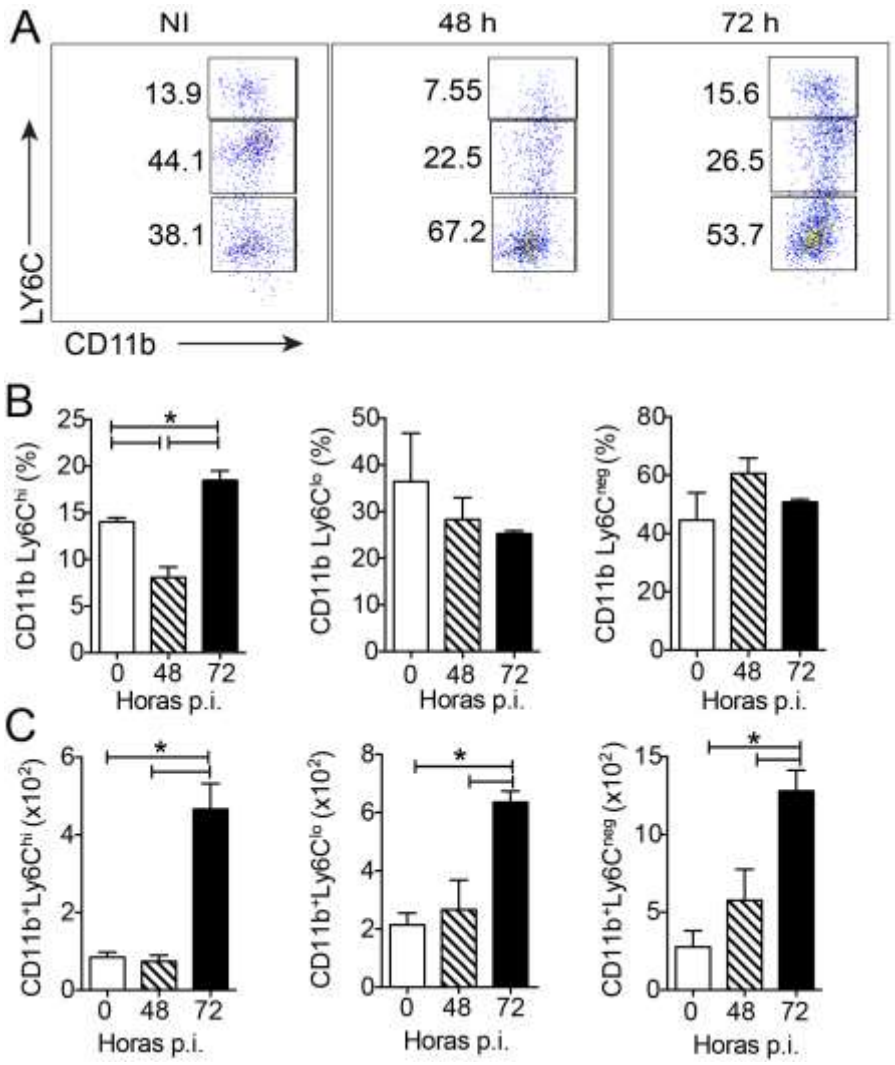

Figura 6. Caracterização de monócitos inflamatórios presentes no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ após a infecção por ZIKV. Camundongos IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV e após 48 e 72 horas, os leucócitos isolados do SNC foram caracterizadas quanto a expressão de CD11b e Ly6C por citometria de fluxo. (A) *Dot plot* representativo da frequência de monócitos inflamatórios CD11b^{+}Ly6C^{hi}, CD11b^{+}Ly6C^{lo}, CD11b^{+}Ly6C^{neg} em diferentes tempos de infecção avaliados na população de células inflamatórias CD11b^{+}CD45^{hi}. (B e C) A frequência e o número absoluto das 3 subpopulações de monócitos citados acima presentes no SNC após a infecção com vírus ZIKA. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

4.5. Infecção experimental com ZIKV induz a expressão de quimiocinas e seus receptores no SNC

Os monócitos são células efetoras da resposta imune que possuem receptores de quimiocinas, responsáveis pela migração dessas células para para os tecidos durante infecções (Geissmann, Manz et al. 2010). Para avaliar o perfil da expressão de quimiocinas importantes para o recrutamento de monócitos e seus receptores ao longo da infecção com o vírus ZIKV, animais C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV 1x10^{5} PFU por via intraperitoneal e a expressão do mRNA para as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, e os receptores de quimiocinas CCR2, CCR4 e CCR5 no SNC foi avaliado com 24, 48 e 72h após a infecção e em animais não infectados, como controle, por PCR quantitativo.

Relativo à expressão das quimiocinas, obervamos um aumento significativo na expressão de CCL2 e CCL5 com 48h e 72h após a infecção nos animais C57BL/6 (Figura 7A e 7D). Além disso, houve aumento da expressão dos receptores CCR2, CCR4 e CCR5 comparado aos animais não infectados com 48h (Figura 7D, 7E e 7G), que coincide com o pico do recrutamento de monócitos no SNC com 48h nos animais C57BL/6 (Figura 5). Não houve diferença na expressão de CCL3 (Figura 7B) e CCL4 (Figura 7C).

Os animais IFNAR$^{-/-}$ apresentaram aumento da expressão das quimiocinas CCL2 (Figure 8A) e CCL4 (Figure 8C) com 24h após a infecção. Houve aumento da expressão dos receptores CCR2 (Figure 8E) e CCR4 (Figure 8F) com 48h e CCR5 (Figure 8G) com 24h após a infecção.

Dentre as quimiocinas envolvidas no recrutamento de monócitos, a CCL2 possui papel essencial (Charo and Peters 2003; Serbina, Jia et al. 2008). Para avaliar a presença da CCL2 em termos expressão proteica no CNS, animais C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com 1x10^{5} PFU por via intraperitoneal e 48 horas após infecção a quimiocina CCL2 foi avaliada no SNC pelo método de Imunohistoquímica.

Observamos que a infecção com o vírus ZIKV induz a expressão de CCL2 no SNC de ambos os grupos C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$. Entretanto, os animais

IFNAR$^{-/-}$ apresentaram menor presença de marcação para CCL2 quando comparado com as secções de tecido provenientes dos animais C57BL/6 infectados (Figure 9).

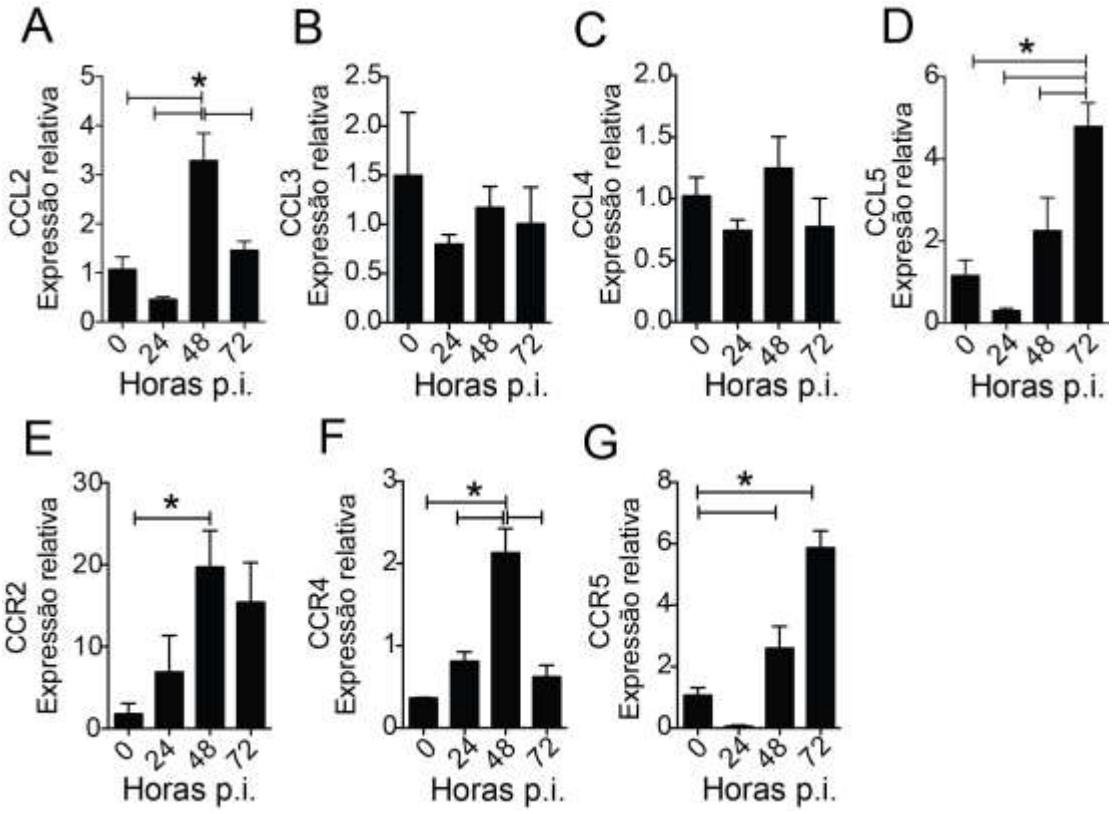

Figura 7. Expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no SNC de animais C57BL/6 após a infecção por ZIKV. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV e após 24, 48 e 72 horas de infecção, um fragmento do SNC foi coletado para extração de RNA. A expressão relativa dos seguintes genes (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL4, (D) CCL5, (E) CCR2, (F) CCR4 e (G) CCR5 foram determinados por qPCR. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

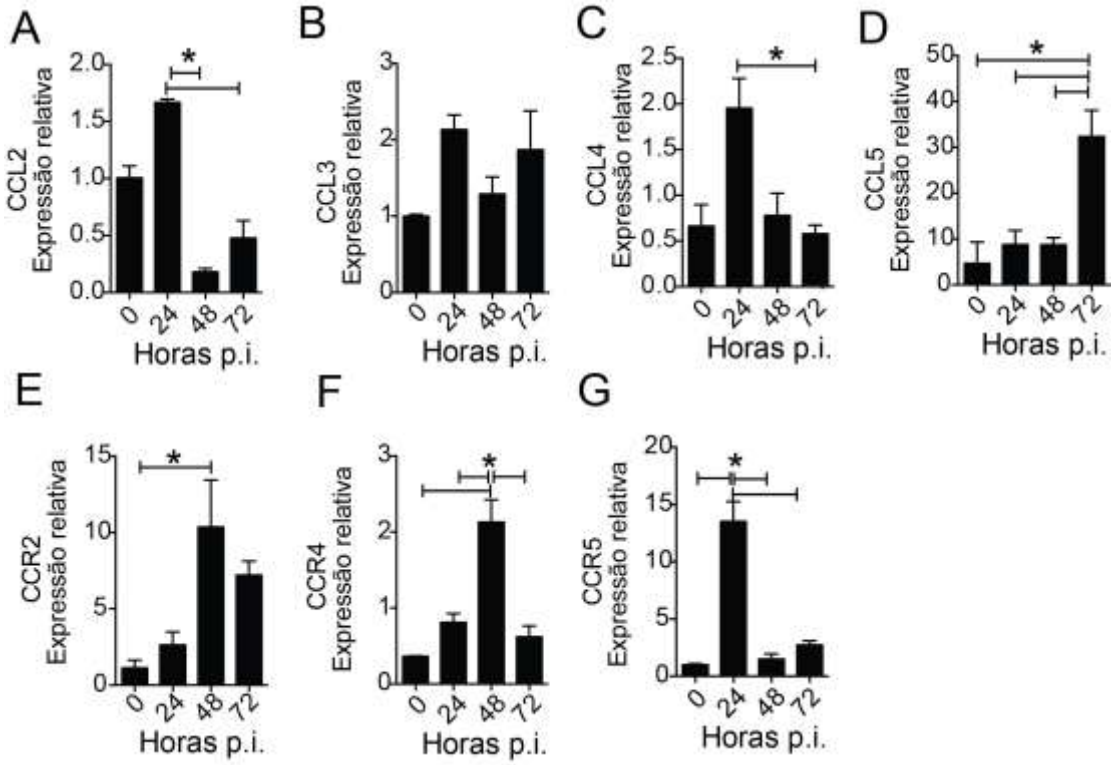

Figura 8. Expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ após a infecção por ZIKV. Camundongos IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV e após 24, 48 e 72 horas de infecção, um fragmento do SNC foi coletado para extração de RNA. A expressão relativa dos seguintes genes (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL4, (D) CCL5, (E) CCR2, (F) CCR4 e (G) CCR5 foram determinados por qPCR. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

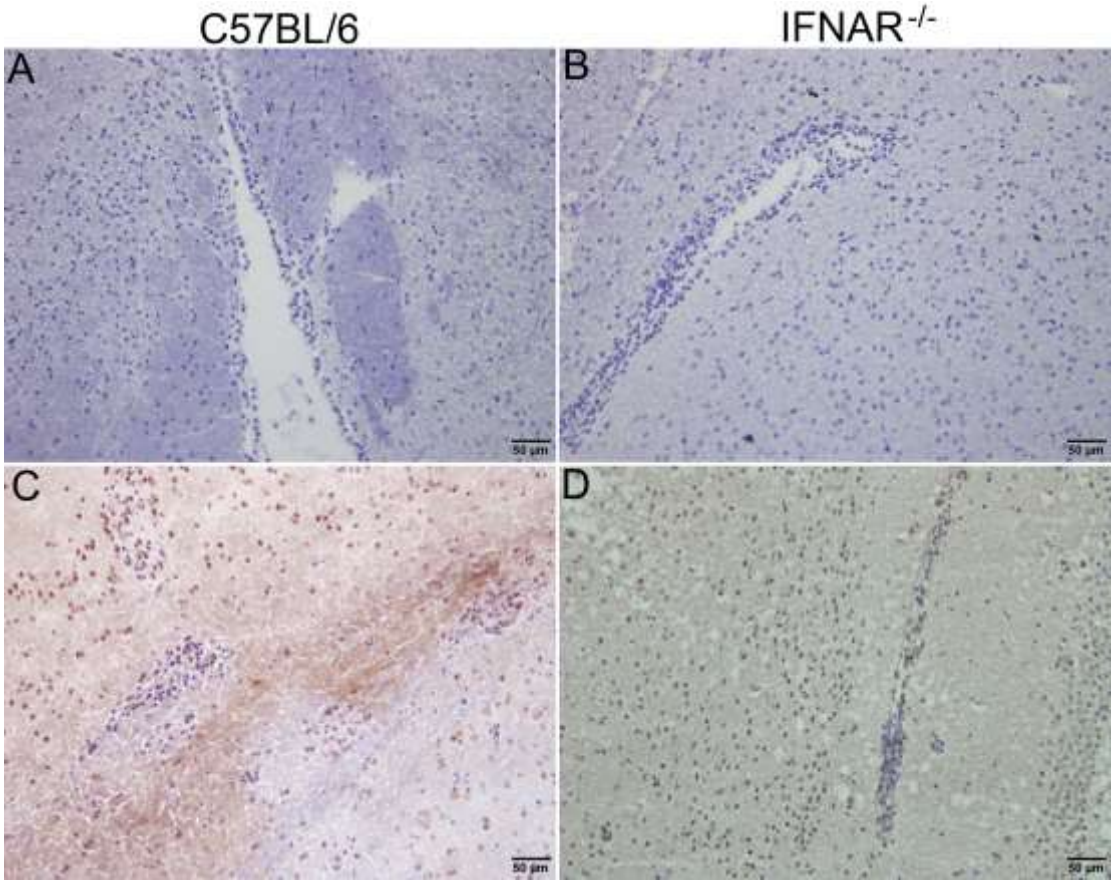

Figura 9. Detecção da quimiocina CCL2 no SNC de animais infectados por ZIKV. Camundongos C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV e após 48 horas de infecção, um fragmento do SNC foi coletado para a detecção de CCL2 por imunohistoquímica. O painel superior (A e B) representa as amostras de SNC de camundongos não infectados e (C e D) de amostras de SNC de camundongos infectados.

4.6. CCR2 é importante para migração de monócitos inflamatórios para SNC durante a infecção pelo ZIKV.

Para investigar a participação dos receptores de quimiocinas no recrutamento de monócitos durante a infecção pelo vírus ZIKV, animais C57BL/6, CCR2$^{-/-}$, CCR4$^{-/-}$ e CCR5$^{-/-}$ foram infectados com 1x10^{5} PFU por via intraperitoneal e 48 horas após infecção a migração de leucócitos para o SNC foi avaliada segundo a expressão de CD11b e CD45, bem como as subpopulações de monócitos de acordo com a expressão de LYC6 e CD11b.

Os resultados demonstram a presença de duas populações leucocitárias, uma população caracterizadas por $CD11b^{+}CD45^{hi}$ e uma população de micróglia caracterizada por $CD11b^{+}CD45^{lo}$ no SNC dos animais C57BL/6, $CCR2^{-/-}$, $CCR4^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$, entretanto não foi observada nenhuma diferença na frequência dessas células entre os grupos (Figura 10A).

Referente às subpopulações de monócitos, observamos uma redução significativa na frequência de monócitos inflamatórios ($CD11b^{+}Ly6C^{hi}$) nos animais $CCR2^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ em comparação com aos animais C57BL/6. Nenhuma diferença significativa foi observada nos animais $CCR4^{-/-}$ infectados (Figura 10B).

Dessa forma, os dados demonstram que a migração de monócitos inflamatórios para SNC dos animais infectados com vírus ZIKA é dependente de CCR2 e CCR5.

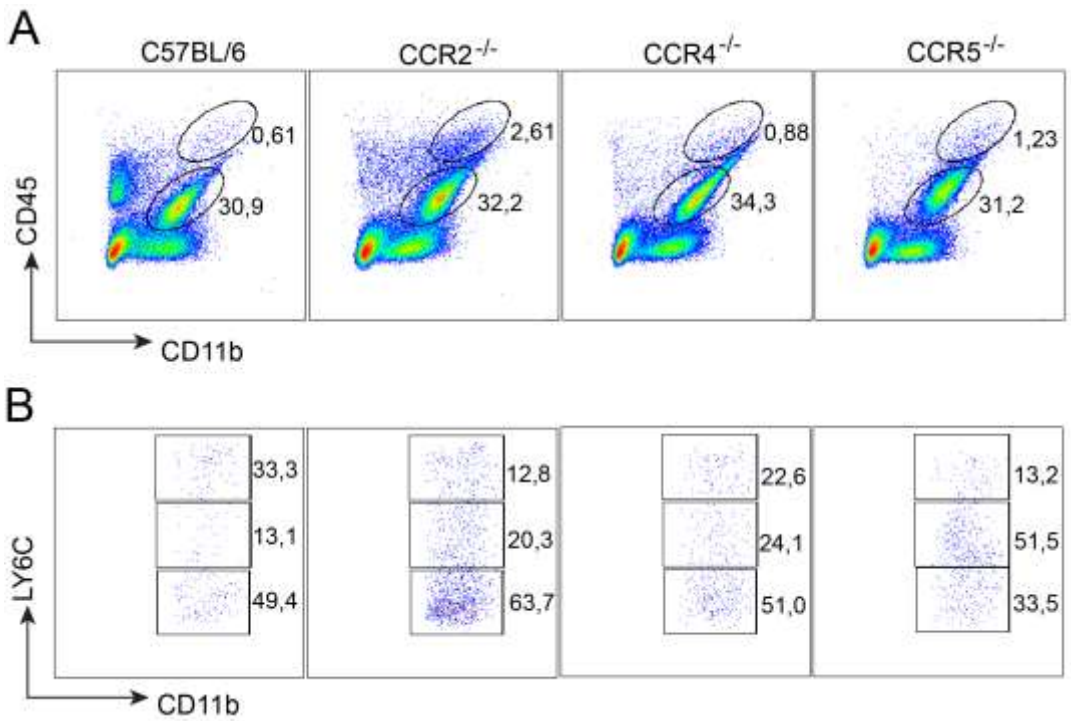

Figura 10. Quantificação de monócitos inflamatórios em animais deficientes de CCR2, CCR4 e CCR5 infectados com ZIKV. Animais C57BL/6, CCR2$^{-/-}$, CCR4$^{-/-}$ e CCR5$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV e após 48 horas de infecção, os leucócitos isolados do SNC foram quantificados por citometria de fluxo quanto a expressão de CD11b, CD45 e Ly6C. (A) *Dot plot* representativo da frequência de células inflamatórias (CD11b^{+}CD45^{hi}) e de micróglia (CD11b^{+}CD45^{lo}) presentes no SNC. (B) *Dot plot* representativo da frequência de monócitos inflamatórios CD11b^{+}Ly6C^{hi}, CD11b^{+}Ly6C^{lo}, CD11b^{+}Ly6C^{neg} na população de células inflamatórias CD11b^{+}CD45^{hi}. Os resultados representam pool de 4 animais a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental.

4.7. Produção de mediadores inflamatórios é dependente da sinalização de IFNAR durante a infecção pelo ZIKV

Para compreender o papel da sinalização do IFNAR na expressão de mediadores inflamatórios importantes para o controle da infecção pelo vírus ZIKA, camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV e após 24, 48 e 72

horas de infecção e a expressão de mRNA para *il-6, il-1β, il-18 e tnf-α* foi avaliada no SNC por PCR quantitativo.

Os dados demonstram que a infecção pelo vírus ZIKA induz a expressão de mRNA para *il-6 e il-18*, como pico de expressão com 48h após infecção nos animais C57BL/6 (Figura 11A e 11B) Em contrapartida, a infecção com vírus ZIKA não induziu a expressão de mRNA para as citocinas *il-6, il-1β, il-18 e tnf-α* no SNC dos animais IFNAR$^{-/-}$ (Figura 12), demonstrando a importância dessa via de sinalização na indução da resposta inflamatória durante a infecção pelo vírus ZIKA.

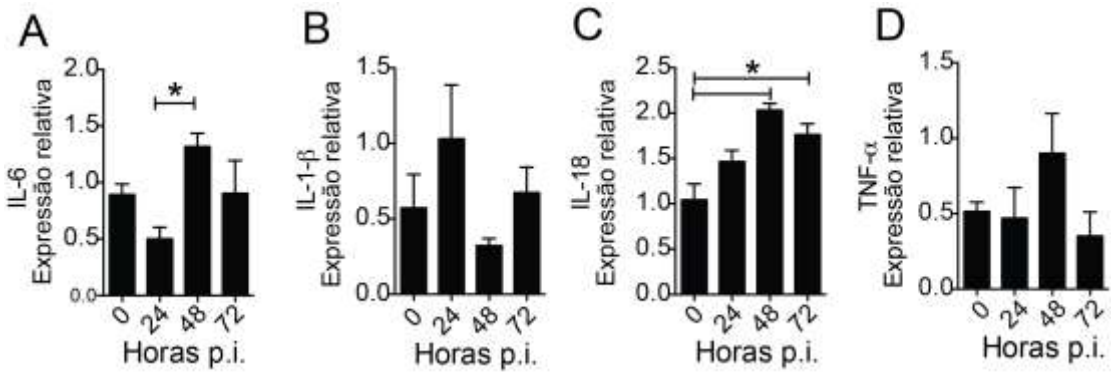

Figura 11. Expressão de citocinas no SNC de animais C57BL/6 infectados por ZIKV. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV e após 24, 48 e 72 horas de infecção, um fragmento do SNC foi coletado para extração de RNA. A expressão relativa dos seguintes genes (A) IL-6, (B) IL-1β, (C) IL-18 e (D) TNF-α foram determinados por qPCR. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

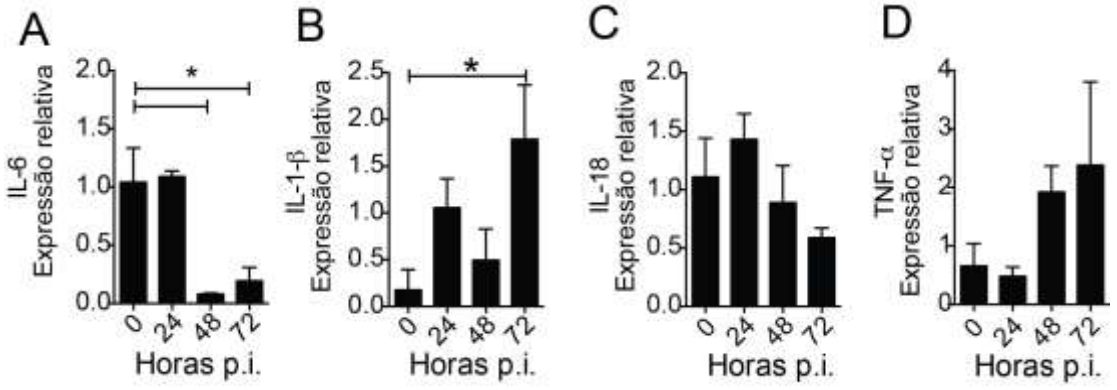

Figura 12. Expressão de citocinas no SNC de animais IFNAR$^{-/-}$ infectados por ZIKV. Camundongos IFNAR$^{-/-}$ foram infectados com ZIKV e após 24, 48 e 72 horas de infecção, um fragmento do SNC foi coletado para extração de RNA. A expressão relativa dos seguintes genes (A) IL-6, (B) IL-1β, (C) IL-18 e (D) TNF-α foram determinados por qPCR. Os resultados representam a média ± SEM de 4 animais por grupo experimental. (* $P < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

O vírus ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* que inclui vários agentes etiológicos**.** O recente ressurgimento da infecção por ZIKV, e sua associação com anomalias congênitas durante a gravidez tem chamado a atenção global (Brasil, Pereira et al. 2016; Melo, Aguiar et al. 2016; Parra, Lizarazo et al. 2016).

A maioria dos indivíduos infectados por vírus ZIKV não apresentam sintomatologia, ou seja, não desenvolvem doença; no entanto, alguns pacientes desenvolvem uma doença grave com dano neurológico permanente, uma vez que a exposição ao ZIKV, durante a gravidez, pode levar a efeitos devastadores no desenvolvimento do feto e outros efeitos como restrição do crescimento cerebral, aborto prematuro, más formações congênitas ou morte (Brasil, Pereira et al. 2016; Cofre 2016)

O entendimento acerca dos mecanismos que levam o vírus ZIKA a causar graves problemas durante a gravidez ainda permanece indefinido (Cofre 2016). A associação desta pandemia com problemas congênitos, SGB e a rápida disseminação do vírus, chamaram a atenção da saúde pública internacional, levando a OMS a declarar vírus ZIKV uma doença emergente (15).

Evidências crescentes indicam que os monócitos inflamatórios desempenham um papel importante no controle da replicação viral (Serbina, Shi et al. 2012) No presente estudo, utilizamos um modelo experimental de infecção ZIKV para investigar os efeitos do vírus e sua resposta imune no desenvolvimento da doença. Na infecção experimental com animais C57BL/6 e IFNAR$^{-/-}$,os nossos resultados mostraram que os animais deficientes dos receptores de interferon de tipo I são mais suscetíveis a infecção por vírus ZIKV.

Desde 1947 quando foi descoberto o vírus ZIKV, muitos trabalhos foram realizados demonstrando a importância de estudar fisiopatologia da doença (Dick 1952; Bell, Field et al. 1971; Way, Bowen et al. 1976) . Novos estudos vêm mostrar evidencias criticas de neuropatologia e anormalidade fetais

associadas à infecção por ZIKV (Ramos da Silva and Gao 2016). Os fatores que determinam isso são provavelmente numerosos, envolvendo interações complexas entre vírus e hospedeiro que ainda não foram descobertas (Mohanraj Manangeeswaram et al., 2016; (Wu, Zuo et al. 2016).

Ainda se sabe pouco sobre o processo de dinâmica de replicação do ZIKV, assim, para superar esse problema, o desenvolvimento de modelos animais poderiam auxiliar no entendimento da fisiopatologia desse vírus ZIKV, identificar alvos terapêuticos e explorar a segurança e a eficácia de novas terapias e vacinas (Mohanraj Manangeeswaram et al., 2016; (Wu, Zuo et al. 2016).

Dessa forma, a preocupação inicial foi o estabelecimento de um modelo experimental de infecção com vírus ZIKV a ser utilizado na presente pesquisa. Assim, utilizamos um modelo de infecção por via intraperitoneal, mimetizando aproximadamente o que ocorre na infecção humana por vírus ZIKV, através do repasto sanguíneo do mosquito. Este modelo tem sido importante para demonstrar a eficácia do desencadeamento da resposta imune aguda do hospedeiro mediada contra os vírus ZIKV, vírus Chikungunya e o vírus vaccínia (Way, Bowen et al. 1976; Dunay, Damatta et al. 2008; Delaloye, Roger et al. 2009) (Her, Malleret et al. 2010).

Nossos resultados demonstram que durante a infecção com vírus ZIKV, os animais deficientes de receptor de interferon do tipo I ($IFNAR^{-/-}$) são altamente suscetíveis, além de demonstrar uma maior carga viral no SNC 72 horas após a infecção. Os animais C57BL/6 apresentaram em geral, maior carga viral 24 horas após a infecção, sintomas de doença retardada e menos perda de peso corporal, já os camundongos $IFNAR^{-/-}$ desenvolveram tremores, perda de peso e foram a óbito ao nono dia após a infecção.

Os animais $IFNAR^{-/-}$ não possuem mecanismo de sinalização de IFN de tipo I (Schneider, Chevillotte et al. 2014). Sabendo da importância do interferon de tipo I no controle de replicação de vírus, a maior suscetibilidade à infecção com vírus ZIKV provavelmente está relacionada ao papel crítico do IFN de tipo I e III na mediação das respostas antivirais contra o ZIKV (Bayer, Lennemann et al. 2016).

Nossos resultados mostram que os mecanismos da resposta imune inata e adaptativa são importantes para limitar a replicação viral, mas também podem causar danos teciduais levando alterações fisiopatológicas ou danos neurológicos no SNC. Um estudo realizado por Rossi e colaboradores demonstrou que os animais A129 e AG129 de três semanas de idade, deficientes de receptor de interferon de tipo I e de receptor de interferon de tipo II, desenvolveram paralisia e sucumbiram à doença sete dias após a infecção, por outro lado os animais mais velhos apresentaram menos viremia e perda de peso, mas recuperaram-se após o oitavo dia (Aliota, Caine et al. 2016; Rossi, Tesh et al. 2016).

Resultados semelhantes foram observados por Lazear et al (Lazear, Govero et al. 2016) utilizando camundongos triplo *knockout* A129 ou IRF 3/5/7 de 4-6 semanas de idade, infectados com ZIKV da Polinésia Francesa, bem como a cepa Africana ZIKV MR 766 (Lazear, Govero et al. 2016).

Nossos resultados demonstram que a resposta imune é caracterizada no SNC de camundongos C57BL/6 pela produção de IFN de tipo I 48 horas após a infecção e pelo aumento de resposta imune inflamatória nos camundongos IFNAR$^{-/-}$. Os animais C57BL/6 são caracterizados pelo aumento na expressão de IL1β, IL-6, IL-18, TNF-α e pela expressão aumentada de CCR2, CCL2, CCR3, CCR4, CCR5, CCL5 e CCR5, concomitante ao aumento de infiltração de neutrófilos e macrófagos observados pela citomentria de fluxo e pela expressão genica.

Os animais IFNAR$^{-/-}$ apresentaram um diminuição na expressão IL- β, IL-6, IL-18, TNF-α, no entanto podemos sugerir que o aumento da carga viral no SNC, a migração de monócitos inflamatórios e a ativação de micróglia é a principal causa de morte dos animais IFNAR$^{-/-}$ infectados com vírus ZIKA, resultado semelhante foi demonstrado no modelo de infecção com o vírus da encefalite japonesa (Nazmi, Dutta et al. 2011).

Estudos adicionais serão necessários para avaliar os efeitos da infiltração de neutrófilos e monócitos no SNC de camundongos IFNAR$^{-/-}$ infectados, bem como para determinar se monócitos poderiam ser utilizados como alvo terapêutico em seres humanos.

Os nossos resultados demonstraram que os animais infectados com vírus apresentam níveis significativamente elevados de citocinas pro-inflamatórias no SNC e foram a óbito. De fato, os níveis de mRNA para IFNs de tipo I no pico da doença clínica são surpreendentemente baixos e sugerem que o vírus pode interferir com a resposta do IFN de tipo I como foi relatado para outros vírus (Chang, Kubota et al. 2009; Borrow, Martinez-Sobrido et al. 2010) . Nossas observações são consistentes com um estudo recente de Grainger e colaboradores(Grainger, Wohlfert et al. 2013) relatando características semelhantes de células Ly6C^{hi} no modelo de infecção aguda por *Toxoplasma gondi* . (Ginhoux and Jung 2014).

A transmigração de leucócitos no sangue através da barreira hematoencefálica depende de moléculas de adesão e seus receptores. Os monócitos inflamatórios usam o eixo CCR2/CCL2 para sair da medula óssea, mas o mecanismo de atravessar a barreira hematoencefálica é pouco compreendido (Dunay, Damatta et al. 2008; Shi and Pamer 2011), portanto, podem ser moléculas-chave no recrutamento de monócitos inflamatórios Ly6C^{hi} para o SNC. A CD62L (L-selectina), que auxilia as células imunes a entrar em diferentes tecidos (Sperandio, Smith et al. 2003; Leon and Ardavin 2008) são altamente expressas em monócitos Ly6C^{hi} no sangue, mas foi regulada negativamente após sua entrada no SNC.

Os monócitos Ly6C^{hi} também originam os subconjuntos Ly6C^{lo} e Ly6C^{neg} que desempenham funções divergentes, como apresentação de Ag e fagocitose. Assim, monócitos e seus descendentes desempenham funções diversas para controlar a infecção viral no SNC. Aqui nos demonstramos que existem duas populações de células: uma população de leucócitos que expressa os marcadores CD45^{hi} e CD11b+ (48 e 72 horas pós-infecção), e uma outra população denominada micróglia caracterizada pela expressão de CD45^{lo} e CD11b (48 e 72 horas pós infecção no cérebro dos camundongos infectados com vírus ZIKV) em um subconjunto de leucócitos CD45^{hi} e CD11b^{+} e CD45^{lo} e CD11b composto principalmente por leucócitos, derivados de células mieloides, nomeadamente monócitos, neutrófilos, macrófagos e DCs. A micróglia ativada caracteriza-se por células residentes do SNC expressando

níveis elevados de $CD45^{hi}$ e $CD11b^{lo}$ após a infecção dos animais C57BL/6 e $IFNAR^{-/-}$.

Em paralelo estudamos o papel dos leucócitos $CCR2^{+}$ circulantes, particularmente os monócitos $Ly6C^{hi}$, no sangue e infiltrado no cérebro logo após a infecção com vírus ZIKV. Inicialmente, a infecção com ZIKV aumenta o número de monócitos $Ly6C^{hi}$ no sangue e no cérebro dentro de 48 a 72 horas após a infecção. Os monócitos de camundongos são comumente classificados em três subconjuntos de acordo com seu nível de expressão de Ly6C. Os monócitos $Ly6C^{hi}$ expressam altos níveis de CCR2 e são recrutados rapidamente para locais de infecção ou inflamação. Em contraste, os monócitos $Ly6C^{lo}$ expressam baixos níveis de CCR2 e são responsáveis pelo patrulhamento de vasos sanguíneos de células imunes que migram ao longo da superfície luminal dos vasos sanguíneos e monitora células endoteliais.

Usando a citometria de fluxo, caracterizamos o perfil das principais células imunes que circulam no sangue e migram para o SNC dos animais infectados com vírus ZIKV**.** O trabalho anterior sugeriu que os camundongos $CCR2^{-/-}$ não sofrem migração de monócitos inflamatórios para o SNC (Serbina, Shi et al. 2012). No entanto, existem evidências recentes de que os monócitos de $Ly6C^{hi}$ podem contribuir para reparo de tecido no SNC após infecção com vírus ZIKV. (Serbina, Shi et al. 2012).

Nossos achados são consistentes com outras evidências de efeitos protetores dos monócitos $Ly6C^{hi}$ no SNC dos camundongos infectados com vírus ZIKV (Serbina, Shi et al. 2012).

Em conclusão, os resultados contidos nesse trabalho sugerem que, durante a infecção cerebral por vírus ZIKV, os monócitos inflamatórios $Ly6C^{hi}$ infiltram-se no SNC, se diferenciam em subgrupos de células fenotípicamente e funcionalmente distintas e desempenham funções centrais para controlar a infecção viral.

Durante o processo de infecção ou de inflamação há produção de grandes quantidades de quimiocinas CCL2 por micróglia, astrocitos e neurônios. A quimiocina CCL2 liga-se ao seu receptor de quimiocina CCR2

expresso em grande quantidade pelos monócitos inflamatórios LYC6^{hi} e promove a migração dos monócitos da circulação para o SNC infectado, onde diferenciam-se em CD45^{hi} LYC6^{hi} (macrófago) e ou micróglia CD45^{lo} LYC6^{lo} (Terry, Getts et al. 2012).

Os trabalhos publicados anteriormente demonstraram a importância do receptor de quimiocina CCR2 para monócito inflamatório Ly6c^{hi} no SNC de animais infectados com vírus encefalite WNV. Isso foi mostrado molecularmente que monócitos inflamatórios se acumulam no SNC dos animais e humanos e são importantes para sobrevivência dos animais infectados(Sampson, Ambrosi et al. 2000; Getts, Terry et al. 2008; Her, Malleret et al. 2010; Shi and Pamer 2011; Lazear, Govero et al. 2016). Por outro lado a deficiência de CCR2 leva uma diminuição de sobrevivência dos animais e aumento de carga viral no SNC dos animais infectados com vírus.

Nossos resultados demonstraram que a quimiocina CCL2 é importante para migração dos leucócitos do sangue para SNC de animais infectados, além de ser importante no controle da replicação do vírus no SNC. A deficiência dos leucócitos no SNC dos animais CCR2$^{-/-}$ infectados com vírus ZIKV, exclusivamente ligados à redução dos monócitos, leva-nos a acreditar que CCL2 é importante para o recrutamento de monócitos inflamatórios para SNC dos animais infectados com vírus ZIKA. Os estudos adicionais serão importantes para esclarecer se também ocorre deficiência de células T assim como outros subgrupos de leucócitos.

Por outro lado, embora os ligantes de mRNA de CCL2, CCL4 e CCL5 estejam aumentados durante a infecção com vírus ZIKA no SNC, o CCR2 parece ser dispensável para o recrutamento de monócitos do sangue para o SNC dos animais infectados com ZIKA.

Sabendo do papel critico de CCR2 na migração de monócitos do sangue para o SNC, começamos a investigar se outros receptores de quimiocinas poderiam estar envolvidos na migração de monócitos inflamatórios para o SNC dos animais infectados com vírus ZIKV. Nossos resultados demonstraram que nos animais deficientes CCR4$^{-/-}$ e CCR5$^{-/-}$ ocorre migração de monócitos inflamatórios 48 horas após a infecção com ZIKV.

Estudos anteriores vêm mostrando um papel dominante do receptor de quimiocina CCR5 na migração de monócitos, células T e células NK para o SNC (Glass, Lim et al. 2005). Outro trabalho mostra que CCR2 está envolvido muito cedo na migração de monócitos inflamatórios pós-infecção (Lim, Obara et al. 2011). Os autores já tinham demonstrado que CCR5 desempenha um papel importante na migração de monócitos e no possível controle de replicação viral no SNC durante a infecção com vírus. Resultado semelhante foi encontrado no nosso estudo, quando infectamos camundongos com vírus ZIKV e observamos a migração de monócitos 48 horas pós-infecção; o seu mecanismo de ação preciso ainda não foi definido e pode variar dependendo do modelo (Lim, Obara et al. 2011).

Outro trabalho publicado recentemente usando um modelo de infecção intranasal letal sugeriu que os monócitos podem desempenhar um papel patogênico, uma vez que o atraso na migração dessas células prolonga a sobrevivência. O mecanismo pode envolver a produção de células de macrófagos e micróglias, estas ativadas produzem substâncias potencialmente tóxicas para o tecido como ânion superóxido, NO e citocinas pró-inflamatórias (Chao, Hu et al. 1992; Block, Zecca et al. 2007).

(Ben-Nathan, Huitinga et al. 1996) mostraram que os monócitos podem ser protetores, pois a depleção usando lipossomas carregados com clodronato diminuiu a sobrevivência de camundongos infectados;. (Ben-Nathan, Huitinga et al. 1996). isso também é plausível, já que o papel benéfico das células do macrófago e micróglia na recuperação do SNC também foi demonstrado pela produção de fatores neurotróficos, remoção de detritos e regeneração axonal (Dougherty, Dreyfus et al. 2000; Yin, Cui et al. 2003) . De acordo com os nossos resultados sugerimos que a migração de monócitos inflamatórios nos animais infectados com vírus ZIKV depende de CCR2.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

De maneira geral, podemos concluir que os animais C57BL/6 são resistentes à infecção por ZIKV, uma vez que a via de sinalização de IFN do tipo I está envolvida no recrutamento de monócitos inflamatórios para SNC logo no início da infecção, contribuindo para o controle da replicação viral. A migração dos monócitos para o SNC é dependente da produção de CCL2 e da expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 durante a infecção por ZIKV.

7.REFERÊNCIAS

7. Referencias

Aliota, M. T., E. A. Caine, et al. (2016). "Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice." PLoS Negl Trop Dis **10**(4): e0004682.

Andrade, D. V. and E. Harris (2017). "Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure." Virus Res.

Auffray, C., D. Fogg, et al. (2007). "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior." Science **317**(5838): 666-670.

Auffray, C., D. K. Fogg, et al. (2009). "CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation." J Exp Med **206**(3): 595-606.

Bardina, S. V., P. Bunduc, et al. (2017). "Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antiflavivirus immunity." Science **356**(6334): 175-180.

Barzon, L., M. Pacenti, et al. (2016). "Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016." Euro Surveill **21**(32).

Bayer, A., N. J. Lennemann, et al. (2016). "Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection." Cell Host Microbe **19**(5): 705-712.

Bell, T. M., E. J. Field, et al. (1971). "Zika virus infection of the central nervous system of mice." Arch Gesamte Virusforsch **35**(2): 183-193.

Ben-Nathan, D., I. Huitinga, et al. (1996). "West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice." Arch Virol **141**(3-4): 459-469.

Blaney, J. E., Jr., J. M. Matro, et al. (2005). "Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys." J Virol **79**(9): 5516-5528.

Block, M. L., L. Zecca, et al. (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." Nat Rev Neurosci **8**(1): 57-69.

Borrow, P., L. Martinez-Sobrido, et al. (2010). "Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection." Viruses **2**(11): 2443-2480.

Bowen, J. R., K. M. Quicke, et al. (2017). "Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells." PLoS Pathog **13**(2): e1006164.

Brasil, P., G. A. Calvet, et al. (2016). "Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects." PLoS Negl Trop Dis **10**(4): e0004636.

Brasil, P., J. P. Pereira, Jr., et al. (2016). "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro." N Engl J Med **375**(24): 2321-2334.

Brasil, P., J. P. Pereira, Jr., et al. (2016). "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report." N Engl J Med.

Calvet, G., R. S. Aguiar, et al. (2016). "Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study." Lancet Infect Dis **16**(6): 653-660.

Carteaux, G., M. Maquart, et al. (2016). "Zika Virus Associated with Meningoencephalitis." N Engl J Med **374**(16): 1595-1596.

Chambers, T. J., C. S. Hahn, et al. (1990). "Flavivirus genome organization, expression, and replication." Annu Rev Microbiol **44**: 649-688.

Chang, T. H., T. Kubota, et al. (2009). "Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery." PLoS Pathog **5**(6): e1000493.

Chao, C. C., S. Hu, et al. (1992). "Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism." J Immunol **149**(8): 2736-2741.

Charo, I. F. and W. Peters (2003). "Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization." Microcirculation **10**(3-4): 259-264.

Chen, Y., T. Maguire, et al. (1997). "Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate." Nat Med **3**(8): 866-871.

Chiang, C. Y., M. H. Huang, et al. (2012). "Dengue-1 envelope protein domain III along with PELC and CpG oligodeoxynucleotides synergistically enhances immune responses." PLoS Negl Trop Dis **6**(5): e1645.

Cockburn, J. J., M. E. Navarro Sanchez, et al. (2012). "Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus." EMBO J **31**(3): 767-779.

Cofre, F. (2016). "[Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?]." Rev Chilena Infectol **33**(1): 96.

Delaloye, J., T. Roger, et al. (2009). "Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome." PLoS Pathog **5**(6): e1000480.

Diallo, D., A. A. Sall, et al. (2014). "Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011." PLoS One **9**(10): e109442.

Diamond, M. S. and T. C. Pierson (2015). "Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control." Cell **162**(3): 488-492.

Dick, G. W. (1952). "Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties." Trans R Soc Trop Med Hyg **46**(5): 521-534.

Dick, G. W., S. F. Kitchen, et al. (1952). "Zika virus. I. Isolations and serological specificity." Trans R Soc Trop Med Hyg **46**(5): 509-520.

Dougherty, K. D., C. F. Dreyfus, et al. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury." Neurobiol Dis **7**(6 Pt B): 574-585.

Dowd, K. A., C. R. DeMaso, et al. (2016). "Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype." Cell Rep **16**(6): 1485-1491.

Duffy, M. R., T. H. Chen, et al. (2009). "Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia." N Engl J Med **360**(24): 2536-2543.

Dunay, I. R., R. A. Damatta, et al. (2008). "Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen Toxoplasma gondii." Immunity **29**(2): 306-317.

Elong Ngono, A., E. A. Vizcarra, et al. (2017). "Mapping and Role of the CD8(+) T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice." Cell Host Microbe **21**(1): 35-46.

Faria, N. R., R. D. D. Azevedo, et al. (2016). "Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings." Science **352**(6283): 345-349.

Gack, M. U., Y. C. Shin, et al. (2007). "TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity." Nature **446**(7138): 916-920.

Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.

Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Getts, D. R., R. L. Terry, et al. (2008). "Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis." J Exp Med **205**(10): 2319-2337.

Ginhoux, F. and S. Jung (2014). "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis." Nat Rev Immunol **14**(6): 392-404.

Glass, W. G., J. K. Lim, et al. (2005). "Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection." J Exp Med **202**(8): 1087-1098.

Grainger, J. R., E. A. Wohlfert, et al. (2013). "Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection." Nat Med **19**(6): 713-721.

Guzman, M. G., S. B. Halstead, et al. (2010). "Dengue: a continuing global threat." Nat Rev Microbiol **8**(12 Suppl): S7-16.

Haddow, A. D., A. J. Schuh, et al. (2012). "Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1477.

Hayes, E. B. (2009). "Zika virus outside Africa." Emerg Infect Dis **15**(9): 1347-1350.

Her, Z., B. Malleret, et al. (2010). "Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response." J Immunol **184**(10): 5903-5913.

Hirsch, A. J., J. L. Smith, et al. (2017). "Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues." PLoS Pathog **13**(3): e1006219.

Kuno, G. and G. J. Chang (2007). "Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses." Arch Virol **152**(4): 687-696.

Lanciotti, R. S., O. L. Kosoy, et al. (2008). "Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007." Emerg Infect Dis **14**(8): 1232-1239.

Lazear, H. M. and M. S. Diamond (2016). "Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere." J Virol **90**(10): 4864-4875.

Lazear, H. M., J. Govero, et al. (2016). "A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis." Cell Host Microbe **19**(5): 720-730.

Ledermann, J. P., L. Guillaumot, et al. (2014). "Aedes hensilli as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses." PLoS Negl Trop Dis **8**(10): e3188.

Leon, B. and C. Ardavin (2008). "Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1." Blood **111**(6): 3126-3130.

Li, M. I., P. S. Wong, et al. (2012). "Oral susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika virus." PLoS Negl Trop Dis **6**(8): e1792.

Lim, J. K., C. J. Obara, et al. (2011). "Chemokine receptor Ccr2 is critical for monocyte accumulation and survival in West Nile virus encephalitis." J Immunol **186**(1): 471-478.

Liu, Y., J. Liu, et al. (2017). "Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in Aedes aegypti mosquitoes." Nature **545**(7655): 482-486.

Lok, S. M., V. Kostyuchenko, et al. (2008). "Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins." Nat Struct Mol Biol **15**(3): 312-317.

Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." Immunity **34**(5): 680-692.

Manangeeswaran, M., D. D. Ireland, et al. (2016). "Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice." PLoS Pathog **12**(11): e1006004.

Mansuy, J. M., C. Pasquier, et al. (2016). "Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area." Lancet Infect Dis **16**(8): 894-895.

Marchette, N. J., R. Garcia, et al. (1969). "Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia." Am J Trop Med Hyg **18**(3): 411-415.

Meertens, L., X. Carnec, et al. (2012). "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry." Cell Host Microbe **12**(4): 544-557.

Melo, A. S., R. S. Aguiar, et al. (2016). "Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly." JAMA Neurol **73**(12): 1407-1416.

Metsky, H. C., C. B. Matranga, et al. (2017). "Zika virus evolution and spread in the Americas." Nature **546**(7658): 411-415.

Miller, J. L., B. J. de Wet, et al. (2008). "The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages." PLoS Pathog **4**(2): e17.

Mlakar, J., M. Korva, et al. (2016). "Zika Virus Associated with Microcephaly." N Engl J Med **374**(10): 951-958.

Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn, et al. (2005). "A structural perspective of the flavivirus life cycle." Nat Rev Microbiol **3**(1): 13-22.

Musso, D., C. Roche, et al. (2015). "Detection of Zika virus in saliva." J Clin Virol **68**: 53-55.

Nazmi, A., K. Dutta, et al. (2011). "Japanese encephalitis virus-infected macrophages induce neuronal death." J Neuroimmune Pharmacol **6**(3): 420-433.

Oehler, E., L. Watrin, et al. (2014). "Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013." Euro Surveill **19**(9).

Parra, B., J. Lizarazo, et al. (2016). "Guillain-Barre Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia." N Engl J Med **375**(16): 1513-1523.

Pierson, T. C. and M. Kielian (2013). "Flaviviruses: braking the entering." Curr Opin Virol **3**(1): 3-12.

Pierson, T. C. and R. J. Kuhn (2012). "Capturing a virus while it catches its breath." Structure **20**(2): 200-202.

Powell, J. R. and W. J. Tabachnick (2013). "History of domestication and spread of Aedes aegypti--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **108 Suppl 1**: 11-17.

Prestwood, T. R., D. M. Prigozhin, et al. (2008). "A mouse-passaged dengue virus strain with reduced affinity for heparan sulfate causes severe disease in mice by establishing increased systemic viral loads." J Virol **82**(17): 8411-8421.

Priyamvada, L., K. M. Quicke, et al. (2016). "Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(28): 7852-7857.

Ramos da Silva, S. and S. J. Gao (2016). "Zika virus update II: Recent development of animal models-Proofs of association with human pathogenesis." J Med Virol **88**(10): 1657-1658.

Roehrig, J. T., J. Hombach, et al. (2008). "Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses." Viral Immunol **21**(2): 123-132.

Rossi, S. L., R. B. Tesh, et al. (2016). "Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus." Am J Trop Med Hyg **94**(6): 1362-1369.

Sampson, B. A., C. Ambrosi, et al. (2000). "The pathology of human West Nile Virus infection." Hum Pathol **31**(5): 527-531.

Schneider, W. M., M. D. Chevillotte, et al. (2014). "Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses." Annu Rev Immunol **32**: 513-545.

Serbina, N. V., T. Jia, et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu. Rev. Immunol. **26**: 421-452.

Serbina, N. V., T. Jia, et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu Rev Immunol **26**: 421-452.

Serbina, N. V., C. Shi, et al. (2012). "Monocyte-mediated immune defense against murine Listeria monocytogenes infection." Adv Immunol **113**: 119-134.

Shi, C. and E. G. Pamer (2011). "Monocyte recruitment during infection and inflammation." Nat Rev Immunol **11**(11): 762-774.

Sperandio, M., M. L. Smith, et al. (2003). "P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules." J Exp Med **197**(10): 1355-1363.

Swaminathan, S., R. Schlaberg, et al. (2016). "Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission." N Engl J Med **375**(19): 1907-1909.

Swirski, F. K., P. Libby, et al. (2007). "Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata." J Clin Invest **117**(1): 195-205.

Tappe, D., J. V. Perez-Giron, et al. (2016). "Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase." Med Microbiol Immunol **205**(3): 269-273.

Terry, R. L., D. R. Getts, et al. (2012). "Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis." J Neuroinflammation **9**: 270.

van den Broek, M. F., U. Muller, et al. (1995). "Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors." Immunol Rev **148**: 5-18.

Way, J. H., E. T. Bowen, et al. (1976). "Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice." J Gen Virol **30**(1): 123-130.

Wen, J., W. W. Tang, et al. (2017). "Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8(+) T cells." Nat Microbiol **2**: 17036.

Whitehead, S. S., J. E. Blaney, et al. (2007). "Prospects for a dengue virus vaccine." Nat Rev Microbiol **5**(7): 518-528.

Wies, E., M. K. Wang, et al. (2013). "Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling." Immunity **38**(3): 437-449.

Wikan, N. and D. R. Smith (2016). "Zika virus: history of a newly emerging arbovirus." Lancet Infect Dis **16**(7): e119-e126.

Woollard, K. J. and F. Geissmann (2010). "Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions." Nat Rev Cardiol **7**(2): 77-86.

Wu, K. Y., G. L. Zuo, et al. (2016). "Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice." Cell Res **26**(6): 645-654.

Yin, Y., Q. Cui, et al. (2003). "Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration." J Neurosci **23**(6): 2284-2293.

Zevini, A., D. Olagnier, et al. (2017). "Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways." Trends Immunol **38**(3): 194-205.

Zhang, Z. S., Y. S. Yan, et al. (2007). "High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice." J Virol Methods **143**(2): 125-131.