LILIAN GOMES DE OLIVEIRA

O PAPEL DOS RECEPTORES TAM E SEU LIGANTE, GAS6, DURANTE A INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS EM CAMUNDONGOS SJL E C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2019

LILIAN GOMES DE OLIVEIRA

O PAPEL DOS RECEPTORES TAM E SEU LIGANTE, GAS6, DURANTE A INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS EM CAMUNDONGOS SJL E C57BL/6

Dissertação apresentada ao programa de pósgraduação em imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão Original

São Paulo 2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gomes de Oliveira, Lilian O PAPEL DOS RECEPTORES TAM E SEU LIGANTE, GAS6, DURANTE A INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS EM CAMUNDONGOS SJL E C57BL/6 / Lilian Gomes de Oliveira; orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -- São Paulo, 2019. 65 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Zika vírus. 2. TAM. 3. Gas6. 4. Sindrome congênita. I. Schatzmann Peron, Jean Pierre , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Lilian Gomes de Oliveira

Título da Dissertação: O papel dos receptores TAM e seu ligante, Gas6, durante a infecção por Zika vírus em camundongos SJL e C57BL/6.

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado em sessão pública realizada a/...., considerou a candidata:

() Aprovada () Reprovada

Examinador(a):	Assinatura:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária *Armando de Salles Oliveira*, Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Expressão e ativação dos receptores TAM durante a infecção de macrófagos e células dendríticas por Zika Vírus*", registrado sob o protocolo nº *63/2016*, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em *04/07/2016* pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de <u>4 ano(s) a</u> partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Jean Pierre Schatzmann Peron

20 Julha 2020

- Departamento: Imunologia

- Membros da Equipe: David Anibal Garrido Andrade (Pós-doutorando), Carla Longo (Pós-graduando), Cristiano Rossato (Pós-graduando), Wesley Nogueira Brandão (Pós-graduando), Carolina Manganeli Polonio (Pós-graduando), Nagela Ghabdan Zanluqui (Pós-graduando), Isabela Cunha (Pós-graduando), Lilian Gomes de Oliveira (Pesquisador colaborador)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.br/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Expression and activation of TAM receptors during macrophages and dendritic cells infection by Zika virus*", protocol nº *63/2016*, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on *7/4/2016* by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Jean Pierre Schatzmann Peron

- Team members: David Anibal Garrido Andrade (Postdoctoral Researcher), Carla Longo (Graduate Student), Cristiano Rossato (Graduate Student, Wesley Nogueira Brandão (Graduate Student), Carolina Manganeli Polonio (Graduate Student), Nagela Ghabdan Zanluqui (Graduate Student), Isabela Cunha (Graduate Student), Lilian Gomes de Oliveira (Colaborator Researcher).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6	Macho/male	4-6 semanas/weeks	120

São Paulo, 20 de julho de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP



Cidade Universitària "Armando de Salles Oliveira", Butantă, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.018.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **063/2016/CEUA**, de 04/07/2016, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "*Expressão e ativação dos receptores TAM durante a infecção de macrófagos e células dendríticas por Zika Vírus*", de responsabilidade do Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, do Departamento de Imunologia, para continuidade do estudo:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	C57bl/6	Fêmea	4-6 semanas	1º ano: 72 2º ano: 72
Mus musculus	SJL	Fêmea	4-6 semanas	1º ano: 72 2º ano: 72

São Paulo, 17 de fevereiro de 2017.

Luciane Valuia Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Vice-coordenadora da CEUA-ICB/USP



Cidade Universitària *Armando de Salles Oliveira", Butantă, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.090.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 063/2016/CEUA, aprovado em 04/07/2016, e por solicitação do Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, do departamento de Imunologia, informo que o título do projeto da aluna de mestrado Lilian Gomes de Oliveira foi alterado para "O papel dos receptores TAM e seus ligantes, Gas6, durante a infecção por Zika vírus em camundongos SJL e C57BL/6" por dificuldades na obtenção de células dendríticas e infecção de macrófagos, que impossibilitaram a realização de alguns experimentos.

São Paulo, 14 de junho de 2018.

Luciane Valuri Sita Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Coordenadora CEUA-ICB/USP

À meus pais, Maria e José, com carinho e admiração; À meus irmãos, Tamara, Samara, Camila e João com afeto; À minha madrinha, Gisela, com gratidão; À meu namorado, Lucas, com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, pela oportunidade de fazer parte do grupo, pelas críticas, momentos de descontração, liberdade e principalmente por acreditar no meu trabalho;

À minha mãe, Maria da Conceição, por sempre ser o porto seguro de toda família e pela generosidade em doar sua vida em nosso favor, sem sua leveza e amor nada teria sido fácil;

Ao meu pai, José Matias, por acreditar nos meus sonhos e me incentivar a sempre ir mais longe;

Às minhas irmãs, Camila, Tamara e Samara pela cumplicidade e boas conversas;

À minha madrinha, Gisela, que nos acolheu e foi acolhida como família e nos deu suporte para crescer. Sem seu carinho e apoio nada teria sido possível. Hoje, mais do nunca, percebo o quanto sou grata;

Ao meu namorado, Lucas, pelo amor, companheirismo e apoio nos intermináveis finais de semana de estudo e esforço. A sua presença foi, e é essencial para que eu siga em frente nessa jornada;

Aos colegas do Laboratório de Interações Neurolmunes, Wesley, Nágela, Carolina, Marília e não menos importante, Yan, que se tornaram meus amigos. Agradeço pela convivência ímpar, pelas risadas e pelas discussões científicas.

À Apurwa, nossa indiana brasileira, por abrir minha mente com uma nova cultura e pela paciência com nosso inglês terrível. A sua estadia aqui mudou minha visão de mundo e meu desempenho na língua inglêsa.

À Prof. Dra. Carla Vanina Rothlin, por me acolher em seu laboratório, dar total liberdade para o desenvolvimento deste trabalho, por todas as dicussões e suporte.

Aos meus colegas de Laboratório do Immunobiology department, da Universidade de Yale, Emily, Macy, Maria, Dimitri, Sagie, Lindsey, Surya, Zuzana, Zong Yu e Daniel, pelo agradável ambiente de trabalho, pelo aprendizado e por me fazerem sentir especial.

Aos amigos que fiz durante o intercâmbio, Mariana, Heron, Leila, Júlia, Camila, Jonathan e Darlan, que se tornaram minha família por 6 meses e fizeram de New Haven um lar.

Aos professores de pesquisadores, Dra. Bruna Cunha de Alencar Bargieri, Dr. José Luiz Proença Módena e Dra. Paula Carolina de Souza por aceitarem compor a banca da defesa.

A todos do Departamento de Imunologia que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

ENTIDADES DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, porcessos 2016/21259-0 e 2017/22504-1).

"Um, lembre-se de olhar para as estrelas e não para baixo, para seus pés. Dois, nunca desista do trabalho. Trabalho dá significado e propósito, e a vida está vazia sem eles. Três, se você tiver sorte o suficiente para encontrar o amor, não o deixe ir embora "

Stephen Hawking

1

RESUMO

OLIVEIRA, LG. O papel dos receptores TAM e seu ligante, Gas6, durante a infecção por Zika vírus em camundongos SJL e C57BL/6. 2019. 66f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Introdução. O Zika vírus (ZIKV) emergiu como problema de saúde mundial e ainda demanda esforços da comunidade científica para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em sua infecção na célula hospedeira. O ZIKV faz parte do gênero dos Flavivirus, como o vírus da Dengue, cujo mecanismo de invasão celular é descrito na literatura. Neste, é evidenciado o envolvimento de receptores de membrana da família TAM, como Tyro3, AxI, e Mer, assim como de seus ligantes solúveis, Gas6 e Proteína S num fenômeno chamado de mimetismo apoptótico. Nesse mecanismo a fosfatidilserina presente no envelope viral interage com os receptores TAM e, assim, resulta na internalização da partícula. Estudos conduzidos pelo nosso grupo demonstram uma possível relação entre a expressão aumentada dos receptores TAM e a infecção por ZIKV, bem como a suscetibilidade da linhagem de camundongos SJL à infecção. Entretanto, os mecanismos moleculares dependentes de receptores TAM na infecção por ZIKV ainda não são compreendidos por completo. Objetivo. Avaliar a relevância dos receptores TAM na infecção por ZIKV em modelos experimentais in vitro e in vivo. Resultados e Discussão. Observamos que animais SJL, susceptíveis, possuem níveis de expressão de Tyro3, AxI e Gas6 elevados em comparação aos C57BL/6, resistentes. Neste contexto, demonstramos que a combinação ZIKV+ rmGas6 leva ao aumento da carga viral no baço e no soro de SJL e C57BL/6. Contudo, o tratamento dos animais com bloqueador da função quinase de Axl, R428, não reduziu a quantidade de partículas virais. Interessantemente, verificamos que a infecção de prenhes C57BL/6 com ZIKV+rmGas6 permitiu o aparecimento de alterações fenotípicas nos fetos, o que não foi observado no controle com ZIKV puro. Os experimentos in vitro utilizando células dendríticas e macrófagos não apresentaram diferenças na replicação viral ou na liberação de Gas6 após a infecção, mesmo com a utilização de células nocaute. Conclusão. Em suma, nossos dados corroboram com a literatura em dois pontos distintos. O primeiro deles na dispensabilidade dos TAM para infecção in vitro de células imunocompetentes. O segundo, evidencia o papel dos receptores dependente da presença de Gas6 e na sindrome congênita.

Palavras-Chave: Zika vírus. TAM. Gas6. Síndrome congênita.

ABSTRACT

OLIVEIRA, LG. The role of TAM receptors and its ligand, Gas6, during Zika virus infection in SJL and C57BL/6 mice 2019. 66f. Dissertation (Master thesis in Immunology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Introduction. Zika virus (ZIKV) has emerged as a global health problem and still demands efforts by scientific community to understand the molecular mechanisms involved in its infection in host cells. ZIKV belongs to Flavivirus genus, such as the Dengue virus, whose mechanism of cell invasion is elucidated in the literature. In this, it is clear the involvement of membrane receptors as TAM family, such as Tyro3, Axl, and Mer, as well as their soluble ligands, Gas6 and Protein S in a phenomenon called apoptotic mimicry. In this mechanism, phosphatidylserine exposed in the viral envelope interacts with TAM receptors and, thus, resulting in the internalization of viral particle. Studies conducted by our group demonstrated a possible relationship between increased TAM receptor expression and ZIKV infection, as well as the susceptibility of SJL mouse line to infection. Despite this, the molecular mechanisms related to TAM receptors in ZIKV infection are still not fully understood. Aim. Evaluate the relevance of TAM receptors in ZIKV infection in experimental models in vitro and in vivo. **Results and discussion**. We observed that susceptible SJL animals present higher Tvro3. Axl and Gas6 expression levels compared to resistant C57BL/6. In this context, we demonstrated that the combination of ZIKV+rmGas6 in SJL and C57BL/6 mice leads to increased viral load in spleen and serum. Meanwhile, treatment of animals with Axl kinase blocker, R428, did not reduced the amount of viral particles. Interestingly, we found that C57BL/6 pregnancy infection with ZIKV+rmGas6 allowed the appearance of phenotypic changes in the fetuses, which was not observed in the ZIKV control. In vitro experiments using dendritic cells and macrophages showed no difference in viral replication or Gas6 release after infection, even with the use of AxI knockout cells. **Conclusion**. In short, our data corroborate with the literature in two distinct points. The first one in the dispensability of TAM for in vitro infection of immunocompetent cells. The second, evidences the role of TAM receptors in a dependent on the presence of Gas6.

Keywords: Zika virus. TAM. Gas6. Congenital syndrome

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Mimetismo apoptótico durante a infecção por flavivírus
Figura 2. Estrutura dos receptores TAM e seus ligantes
Figura 3 Interação entre Flavivirus e receptores TAM via Gas6/Proteína S e FS26
Figura 4 Vias de sinalização dos receptores TAM27
Figura 5 O eixo Axl-Gas6 é dispensável na infecção de células dendríticas e
macrófagos in vitro
Figura 6 Infecção por ZIKV não induz a liberação de Gas6 em culturas de células
dendríticas e macrófagos
Figura 7 Gas6 aumenta o número de cópias virais no baço e no soro 1dpi40
Figura 8 Infecção intravenosa não induz o aumento da concentração de Gas6
plasmático41
Figura 9 ZIKV não induz a expressão gênica de TAM, Gas6, Pros1 e Socs342
Figura 10 SJL expressa mais Tyro3, Axl e Gas6 depois da infecção em comparação
à C57BL/643
Figura 11 Linhagem SJL expressa mais genes induzidos por IFN após infecção com
ZIKV+rmGas644
Figura 12 Infecção por ZIKV previamente incubado com rmGas6 torna C57BL/6
suscetível ao desenvolvimento de síndrome congênita45
Figura 13 ZIKV+rmGas6 leva a alterações macroscópicas nos neonatos de
camundongos C57BL/646
Figura 14 Infecção via ICV com ZIKV pré-incubado com Gas6 não afeta a carga viral
no cérebro47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

С	Capsídio
cDNA	DNA complementar
CMC	Carboximetilcelulose
DENV	Dengue vírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA cadeira dupla
E	Envelope
EGF	do inglês: epidermal growth factor
ERK	do inglês: extracellular signal-regulated kinases
FS	Fosfatidilserina
Gas6	do inglês: growth arrest specific 6
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
ICV	Intracranioventricular
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de IFN alpha/beta
IL	Interleucina
IRF	Fator Regulador de IFN
ISGs	Genes induzidos por IFN
JAK	Janus quinase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	do inglês: mitogen Activated Protein Kinases
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MDA-5	do inglês: melanoma differentiation-associated protein 5
mTOR	do inglês: mechanistic target of rapamycin
NPCs	do inglês: neuronal precursor cells
NS	Não-estrutural
OMS	Organização mundial da saúde
PEG	Polietilenoglicol
PFU	do inglês: <i>plaque forming unit</i>

pMr	Pré-membrana
Pros1	Protein S
PRRs	Receptores de reconhecimento de patrão
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIG-I	do inglês: retinoic-acid inducible gene l
rmGas6	Gas6 recombinante de camundongo
RNA	Ácido ribonucleico
sgRNA	RNA simples-guia
SHBG	do inglês: sex hormone-binding globulin
siRNA	RNA de interferência
SOCS	do inglês: suppressor of cytokine signaling
ssRNA	RNA cadeia simples
STAT	do inglês: Signal transducer and activator of transcription
ТАМ	Tyro3, Axl, Mertk
TIM	do inglês: T cell immunoglobulin and mucin domain
TLR	Receptores do tipo Toll
WNV	do inglês West Nile virus
YFV	do inglês Yellow Fever virus
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Panorama geral da infecção por Zika vírus (ZIKV)	18
1.2 Resposta imune inata antiviral	21
1.3 Mimetismo apoptótico	22
1.4 Receptores TAM (Tyro3, Axl e Mertk)	23
1.4.1 Receptores TAM e infecção por ZIKV	28
1.5 Susceptibilidade à infecção	29
2. OBJETIVO	31
2.1 Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Obtenção e Manutenção do ZIKV	32
3.1.1 Propagação em células Vero	32
3.1.2 Propagação em células C6/36	32
3.2 Ensaio de formação de placa	33
3.3 Diferenciação de células derivadas de Medula Óssea	33
3.4 Infecção in vitro	34
3.5 ELISA para detecção de Gas6	34
3.6 Experimentos in vivo	34
3.7 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)	35
3.8 Quantificação por PCR em Tempo Real	36
3.9 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS OBTIDOS	38
4.1 Ausência de Axl não afeta a infecção de células dendríticas e macrófa derivados de medula óssea.	gos 38
4.2 Gas6 possui papel na infecção por ZIKV em camundongos SJL e C57B	L/6. 39
4.3 A infecção por ZIKV não modula a expressão dos receptores TAM e s ligantes.	eus 42
4.4 A linhagem SJL expressa maiores quantidades de <i>Tyro3</i> , <i>Axl</i> e <i>Mertk</i> apo infecção por ZIKV	ós a 42
4.5 A infecção por ZIKV+rmGas6 induz a expressão de ISGs na linhagem	SJL 43
4.6 Gas6 torna animais C57BL/6 susceptíveis ao desenvolvimento malformações congênitas após infecção por ZIKV	de 44
5. DISCUSSÃO	48

6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	62
A- Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Panorama geral da infecção por Zika vírus (ZIKV)

O Zika vírus (ZIKV) foi isolado em Uganda (África) em 1947 de um macaco Rhesus sentinela utilizado nos estudos de febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O mesmo pertence ao gênero dos *flavivirus*, bem como outros virus de importância médica global, como Dengue (DENV), Febre Amarela (do inglês *Yellow fever* - *YFV*), Oeste do Nilo (do inglês *West Nile - WNV*) entre muitos outros. Sendo também um arbovírus, é transmitido por artrópodes hematófogos, principalemente pelo mosquito *Aedes aegypti*, como verficado por Boorman e Porterfield em 1956 (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956). Os *flavivirus* em geral possuem um genoma composto por uma fita única de RNA de sentido positivo que é traduzido em uma única poliproteina. Esta proteína é clivada dando origem às proteínas estruturais, isto é, envelope (E), capsídeo (C) e pré-membrana (pMr); além de 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (MINER; DIAMOND, 2017), que auxiliam na replicação e no empacotamento do material genético, bem como na subversão dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro, em favor de sua replicação (GRANT et al., 2016a).

O primeiro caso da infecção em humanos foi relatado em 1952 por Smithburn, que encontrou anticorpos neutralizantes no soro da população indígena da África Oriental (SMITHBURN, 1952). Posteriormente, muitos casos de ZIKV foram relatados, demonstrando a propagação gegráfica do vírus. Alguns casos foram notificados na Nigéria (1971-1975) (FAGBAMI, 1979) e na Indonésia (1977-1978)) (OLSON et al., 1981), mas somente em 2007 ocorreram os primeiros casos fora da África e da Ásia, na Ilha de Yap na Micronésia (DUFFY et al., 2009). Desde então, surgiram várias notificações, como a maior, ocorrida na Polinésia Francesa em 2013, onde mais de 32mil casos foram reportados (~11,5% da população) (MUSSO et al., 2018). Dentre esses, 42 casos de síndrome de Guillain-Barré foram notificados.

Em meados de 2015, a infecção por ZIKV foi notificada pela primeira vez no Brasil (ZANLUCA et al., 2015). Surtos da síndrome de Guillain-Barré ocorreram no estado da Bahia (WANG et al., 2013) e no final do mesmo ano houve o aumento de casos de microcefalia no Pernambuco (COULOMBIER et al., 2015). Com base na associação entre a infecção por ZIKV e desordens neurológicas a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou Estado de Preocupação Global (LUPTON, 2016). Foram estimados entre 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos no país no mesmo ano. Em 2016, 48 regiões nas Américas reportaram aproximadamente 532 mil casos suspeitos com mais de 175 mil casos confirmados. Além disso, 22 desses países notificaram síndromes congênitas associadas a infecção por ZIKV e 5 países reportaram casos de transmissão sexual (IKEJEZIE et al., 2017; PAHO, 2016). Contudo, em 2017 e 2018 o número de casos nas Américas e no Caribe diminuíram significativamente e, atualmente, pequenos surtos isolados ao redor do mundo têm ocorrido, o mais recente, reportado no estado do Rajastão na Índia (2018) (ECDC, 2019).

A infecção por ZIKV em adultos é autolimitada, sendo resolvida em poucos dias e, embora na maioria dos casos assintomática, 20% dos infectados podem desenvolver sintomas como febre baixa, artrite e artralgia (com inchaço das pequenas articulações), erupções cutâneas e hiperemia conjuntiva (DUFFY et al., 2009). Alguns casos, entretanto, podem evoluir para uma doença mais grave, levando à trombocitopenia (KARIMI et al., 2016) ou até mesmo falência múltipla de órgãos (SWAMINATHAN et al., 2016). Esses casos são, entretanto, raros e em comparação às outras flaviviroses, o ZIKV é menos patogênico em adultos. Em fetos, por outro lado, o vírus pode levar a alterações desastrosas culminando em microcefalia (MLAKAR et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016), restrição do crescimento intrauterino, calcificação cerebral e anomalias oftalmológicas (CARVALHO et al., 2016; VENTURA et al., 2015).

A microcefalia é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por redução acentuada no tamanho do cérebro e deficiência intelectual, causada por proliferação celular prejudicada e morte de células progenitoras corticais (BARBELANNE; TSANG, 2014). Entre 2015-2016 no Brasil, uma série de casos sintomáticos ocorreu após a infecção de mulheres grávidas, nos quais 42% dos fetos apresentaram algum tipo de anormalidade (BRASIL et al., 2016). Similarmente, uma análise retrospectiva, feita em 2013 na Polinésia Francesa, identificou 95 casos de microcefalia associados à infeção (CAUCHEMEZ et al., 2016). O antígeno e o RNA do ZIKV já foram identificados no líquido amniótico e nos tecidos placentários de mulheres infectadas, bem como nos tecidos cerebrais fetais e de recém-nascidos diagnosticados com microcefalia (BHATNAGAR et al., 2017; DRIGGERS et al., 2016; MARTINES et al., 2016). A relação causal da infecção por ZIKV e o desenvolvimento de malformações congênitas foi comprovada por estudos conduzidos em nosso

laboratório (CUGOLA et al., 2016a), sendo corroborado por outros dois grupos (ZHANG et al., 2016b;MINER et al., 2016).

O ZIKV pode infectar uma variedade de tipos celulares, o que já foi demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em modelos murinos, o vírus foi identificado no córtex cerebral de camundongos neonatos com malformações (CUGOLA et al., 2016a), assim como no plasma, baço, testículos e no cérebro de camundongos *ifnar*^{-/-} adultos (YOCKEY et al., 2016). Em estudos *in vitro* o ZIKV pode infectar células de Hofbauer (macrófagos de placenta) (QUICKE et al., 2016), células epiteliais amnióticas, células humanas primárias de placenta (TABATA et al., 2016a), células endoteliais (LIU et al., 2016a), progenitores neurais (CUGOLA et al., 2016a), células da micróglia (MEERTENS et al., 2017) e astrócitos (CHEN et al., 2018; STEFANIK et al., 2018)

Até 2015, acreditava-se que a única via de transmissão era a vetorial, entretanto, outras vias foram reportadas. A transmissão sexual foi confirmada em humanos (DAVIDSON et al., 2016; MUSSO et al., 2015) e corroborada em modelos experimentais pela presença de vírus no sêmen de camundongos da linhagem AG129 (MCDONALD; DUGGAL; BRAULT, 2017) e pela infecção intra-vaginal de camundongos WT e Ifnar^{-/-} (YOCKEY *et al.*, 2016). Além disso, transfusão sanguínea (BARJAS-CASTRO et al., 2016) e de plaquetas (MOTTA et al., 2016), urina, (ZHANG et al., 2016a); lágrimas (SWAMINATHAN et al., 2016) e saliva (FOURCADE et al., 2016) podem atuar na transmissão, sendo entretanto, formas raras e não habituais.

O ZIKV possui potencial de ser transmitido de humano para humano, sendo que a via de transmissão sexual pode colaborar com cerca de 3% dos casos (GAO et al., 2016). Entretanto, a via mais comum ainda é a picada do mosquito do gênero *Aedes.*

Uma vez inoculado por meio da picada do mosquito-vetor, a pele é o sítio primário da infecção. De fato, foi constatado por Hamel e colaboradores que o vírus pode infectar queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas humanas (HAMEL et al., 2015). É possível ainda que o vírus infecte células imunes inatas, especialmente neutrófilos e monócitos (MICHLMAYR et al., 2017) recrutados após a inflamação local gerada pela picada. Essas células podem carrear o vírus para sítios de infecção distantes, atuando de maneira importante no curso da infecção (PINGEN et al., 2016).

A entrada do vírus nas células alvo é dependente da interação de componentes do envelope viral com proteínas de superfície das células do hospedeiro, as quais, após ativadas, disparam vias endocíticas que culminam na internalização da partícula viral (PERERA-LECOIN et al., 2013). Essas vias englobam de endocitose dependente de clatrina e subsequente diminuição do pH endossomal, levando à mudança estrutural da proteina do envelope que se funde à membrana do endossomo, proporcionando a liberação do RNA viral no citoplasma (BRESSANELLI et al., 2004).

1.2 Resposta imune inata antiviral

Dentro da célula, o material genético viral pode ser reconhecido por mecanimos citoplasmáticos e endossomais da resposta imune inata que ativam vias de resposta imune antiviral e possuem papel importante no desenvolvimento da infecção. Os RNAs virais de cadeia simples (ssRNA) e de cadeia dupla (dsRNA) gerados durante a replicação podem ser detectados pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) das células hospedeiras. RIG-1 detecta ssRNA (PICHLMAIR et al., 2006) e dsRNA (SCHLEE et al., 2009), enquanto MDA5 detecta apenas dsRNA (KATO et al., 2006). A ativação de RIG-1 e MDA5 leva à sinalização das vias de IPS-1 e NF-κB, contribuindo para a expressão de quimiocinas, citocinas, interferons (IFN) tipo I e genes induzidos por interferon (ISGs). Os dsRNA e ssRNA também podem ser detectados, respectivamente, por receptores do tipo toll (TLR) 3 e 7 no compartimento endossomal. Após ativação os TLRs se multimerizam, levando ao recrutamento de TRIF (TLR3) e MyD88 (TLR7). Ambos induzem a ativação e translocação de NF-Kb e fator regulador de IFN (IRF) 3 e 7 para o núcleo. Finalmente, ocorre a expressão de IFNs do tipo I que agem de modo autócrino (mas também parácrino) e atuam através da ligação ao seu receptor (IFNAR), amplificando o estado antiviral celular (KAWAI; AKIRA, 2008).

De forma geral, a resposta imune antiviral é baseada na expressão de IFNs tipo I, sendo essencial no controle das flaviviroses, e diversos modelos murinos deficientes para tais moléculas são utilizados (SAMUEL; DIAMOND, 2005; SHRESTA et al., 2004; YOCKEY et al., 2016). IFNα e IFNβ (tipo I) ativam seu respectivo receptor heterodimérico (IFNAR1/IFNAR2) o que resulta em fosforilação da Janus (Jak) e tirosina (Tyk) quinase, dimerização e translocação nuclear de STAT1 e STAT2, e a transcrição de centenas de ISGs (PERRY et al., 2005).

O ZIKV por sua vez, consegue modular tal via pois evade a resposta de IFN via bloqueio de STAT2. Em células humanas infectadas, a NS5 se liga e direciona STAT2 para degradação proteassomal, porém, é incapaz de se ligar eficientemente

ao Stat2 de camundongo e, portanto, não tem a capacidade de antagonizar a resposta do IFN em modelos murinos (GRANT et al., 2016b). Do mesmo modo, NS5 de DENV também é capaz de se ligar a STAT2 e promover ubiquitinação e degradação (ASHOUR et al., 2009). Isso provavelmente ilustra a necessidade de uma potente inibição da sinalização IFN para o ciclo de vida desse grupo de vírus.

1.3 Mimetismo apoptótico

Após desnudamento do material genético, o vírus inicia sua replicação por meio da montagem do replissomo (complexo formado por suas proteínas não estruturais) no retículo endoplasmático. Uma vez finalizada a tradução de proteínas estruturais e a replicação do genoma viral, a partícula em sí é montada e levada ao complexo de golgi onde é maturada para então ser liberada por exocitose e reiniciar o ciclo infeccioso (ROBY et al., 2015). Interessantemente, durante a tradução e brotamento das proteínas virais no retículo, partes da membrana do retículo são incluídas e se tornam parte do envelope viral. Com isso, as proteínas estruturais E e prM são associadas a porções da membrana ricas em fosfatidilserina (FS) (JEMIELITY et al., 2013a), formando assim o envelope (Fig 1).

A FS no envelope é importante para interação com receptores presentes na membrana das células hospedeiras e pode ter grande relevância para o tropismo, patogenicidade e infectividade viral (MORIZONO; CHEN, 2014). O fosfolipídio é mantido fisiologicamente na face interna da membrana celular por flipases, porém pode ser exposto na face externa da membrana após o início da apoptose num processo mediado pela ativação de scramblases (SEGAWA; NAGATA, 2015). Uma vez na face externa, a FS serve de sinal para a fagocitose de fragmentos apoptóticos, o que auxilia a manutenção da homeostase após o processo de apoptose. Os flavivírus, por sua vez, utilizam esse mecanismo à seu favor ao se ligarem aos receptores de FS das células alvo, realizando assim um mecanismo conhecido como mimetismo apoptótico (PERERA-LECOIN et al., 2013) (Fig 1).



Figura 1. Mimetismo apoptótico durante a infecção por flavivírus.

Flavivírus adquirem o envelope rico em FS por meio do brotamento do retículo endoplasmático. Após deixar as células alvo, infectam células adjacentes via receptores de FS através dos quais são internalizados num mecanismo dependente de clatrina. FONTE (Adaptado de AMARA, A; MERCER, J; 2015).

Atualmente, duas famílias de receptores de fosfatidilserina foram identificadas como relevantes na infecção por flavivírus. São elas: Imunoglobulina de células T e domínio de mucina (do inglês: *T cell immunoglobulin and mucin domain* - TIM) e os receptores de tirosina quinase Tyro3, Axl e Mertk (TAM). Receptores TIM se ligam de maneira direta à FS e têm importância descrita na infecção por DENV (DEJARNAC et al., 2018 LEE; LIAO; LIN, 2005), YFV (MEERTENS et al., 2012a) e WNV(JEMIELITY et al., 2013b), porém pouco se sabe a respeito da sua função na infecção por ZIKV. Por outro lado, os receptores TAM têm seu papel na infecção por ZIKV largamente estudado, e serão descritos detalhadamente a seguir. Via de regra, tanto TIM quanto TAM podem disparar vias intracelulares para favorecer a invasão viral. Dentre estas, podemos citar: endocitose do vírion com auxílio do remodelamento do citoesqueleto, ativação de vias de sobrevivência celular e evasão da resposta imune (OLIVEIRA; PERON, 2019).

1.4 Receptores TAM (Tyro3, Axl e Mertk)

Tyro3, Axl e Mertk são receptores de tirosina quinase e podem atuar em diversos mecanismos como: regulação da resposta imune inata (LAI; LEMKE, 1991; ROTHLIN et al., 2007); depuração de células apoptóticas (ANDERSON et al., 2003) pela ligação indireta à FS via Gas6 (do inglês: *growth arrest specific 6*) ou Pros1 (Proteína S), as quais são ligantes endógenos solúveis de alta afinidade destes receptores (MEERTENS et al., 2012a). Os receptores TAM são expressos em células dos sistemas imune, nervoso, vascular e reprodutivo, embora em diferentes níveis (LEMKE; ROTHLIN, 2008). Tyro3 é encontrado essencialmente no sistema nervoso

central e atua na mielinização de axônios (BINDER; KILPATRICK, 2009), enquanto Mertk e Axl podem ser encontrados em APCs, como células dendríticas e macrófagos (ZAGÓRSKA et al., 2014) nas quais atuam fundamentalmente na regulação da resposta imune e fagocitose de debris celulares e de células apoptóticas (eferocitose).

Os TAMs apresentam dois domínios N-terminais semelhantes aos de imunoglobulinas (± 110aa) (HEIRING; DAHLBÄCK; MULLER, 2004; SASAKI et al., 2006), seguidos de dois domínios de fibronectina do tipo III, sendo um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático de tirosina quinase. Este último é fosforilado após interação com Gas6 ou Pros1, o que leva à ativação de diversas vias de sinalização (Fig. 2).





Os TAM são compostos por domínios extracelulares de Imunoglobulina (Ig e fibronectina do tipo III (FNIII); e intracelular de tirosina quinase. O contato entre os ligantes e os receptores ocorre pela interação dos domínios Ig aos domínios SHBG (do inglês: *sex hormone binding domain*), presente nos ligantes, os quais também possuem domínios EGF e Gla. Este último precisa ser gama carboxilado para se ligar a FS e ativar os receptores efetivamente. FONTE: (LEMKE, 2013).

Pros1 e Gas6 possuem cerca de 42% de identidade estrutural e estão ambos presentes no plasma numa concentração de 300 nM e 0,2 nM, respectivamente, (EKMAN; STENHOFF; DAHLBÄCK, 2010) sendo que Gas6 tem concentração aumentada durante a sepse (EKMAN et al., 2010). Os ligantes apresentam afinidade diferente por cada um dos TAM; Gas6 tem maior afinidade por AxI enquanto Pros1

tem maior afinidade por Mertk, não se ligando à AxI (CHEN; CAREY; GODOWSKI, 1997; FISHER et al., 2005). Ambos ligantes são secretados por células dendríticas derivadas de medula óssea (ROTHLIN et al., 2007), macrófagos peritoneais (SEITZ et al., 2007), células de sertoli (WANG, 2005) e células do sistema nervoso central (PRIETO et al., 1999).

Pros1 além de ter função como ligante, também possui importante e bem elucidado papel na cascata de coagulação independente da ligação aos receptores. Esse papel se dá por Pros 1 ser importante anticoagulante pois é um cofator da proteína C que atua como uma protease direcionada aos fatores Va e VIIIa da coagulação (BURSTYN-COHEN; HEEB; LEMKE, 2009; WALKER, 1980). Gas6 por outro lado, não possui qualquer função independente de Tyro3, Axl e Mertk, mas tem papel largamente descrito, junto com Axl, no câncer (revisado em: WU et al., 2018), na autoimunidade (revisado em: BELLAN et al., 2016), diabetes (revisado em: DIHINGIA; KALITA; MANNA, 2017) e desenvolvimento fetal (revisao em: BURSTYN-COHEN, 2017).

A estrutura dos ligantes é basicamente composta por um domínio N-terminal Gla, rico em ácido glutâmico, seguido de 4 domínios EGF (do inglês: *epidermal growth factor*) e um domínio C-terminal SHBG (do inglês: *sex hormone-binding globulin*). Este último se liga ao domínio Ig do receptor e leva à dimerização e fosforilação dos domínios tirosina quinase (ISHIMOTO et al., 2000; KUNO; CHANG, 2007). É importante ressaltar que o domínio Gla é γ -carboxilado, de maneira depende de vitamina-K, sendo esta modificação requerida para interação com FS (HUANG et al., 2003) (Fig.2).

O potencial de Gas6 e Pros1 de se ligar à FS atua formando uma ponte entre os receptores TAM e partículas virais (Fig. 3). Nesse âmbito já foi demonstrado o papel de TAM durante a infecção por ZIKV (MA et al., 2017; PAGANI et al., 2017; RICHARD et al., 2017; WANG et al., 2017), DENV, CHIKV (Chikungunya), EBOV (vírus Ebola) e WNV (BRIANT et al., 2014; JEMIELITY et al., 2013b; MEERTENS et al., 2012b; MORIZONO; CHEN, 2014).



Figura 3. Interação entre Flavivirus e receptores TAM via Gas6/Proteína S e FS.

Partículas virais se ligam aos receptores TAM via Gas6 ou Pros1 que formam uma ponte com os receptores e proporcionam a ativação via fosforilação dos domínios citoplasmáticos. FONTE: adaptado de (PERERA-LECOIN, 2013)

A formação do complexo FS-Gas6-TAM permite a ativação dos receptores e disparo de diferentes vias de sinalização intracelulares. A região terminal do domínio intracelular dos receptores TAM é fosforilada e ligada ao domínio SH2 da Grb-2, a qual recruta o complexo fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), resultando na fosforilação e ativação da via de Akt. Pode ocorrer também acoplamento à Fosfolipase C, ERK 1/2, Ras e ativação de MAPK (Fig. 4A). Ocorre a posterior mobilização do citoesqueleto de actina auxiliando na endocitose de partículas virais (SHARMA et al., 2010). Esse mecanismo foi observado na internalização de adenovírus e de flavivírus que dependem da ativação de PI3K e AKT (LI et al., 1998; SANLIOGLU et al., 2000), e ERK 1 e 2 (KATSAROU et al., 2010), respectivamente (Fig. 4A). As vias de PI3K-Akt podem convergir também para a via de mTOR, desencadeando mudanças no metabolismo celular que se correlacionam com a persistência do ZIKV, como demonstrado em amostras de macacos Rhesus (AID et al., 2017).

A fosforilação dos domínios citoplasmáticos dos receptores TAM pode levar ainda à ativação de JAK-STAT. Macrófagos e células dendríticas expressam receptores TAM acoplados a cadeia IFNAR1 (ROTHLIN et al., 2007). A ativação desse complexo resulta na sinalização de JAK e translocação de dímeros de STAT-1 fosforilados do citoplasma para o núcleo, o que leva à transcrição de genes supressores da resposta inflamatória como SOCS-1 (do inglês: *suppressor of cytokine signaling*) e SOCS-3 (Fig. 4B) (ZONG et al., 1996). SOCS funcionam como feedback negativo clássico da sinalização de algumas citocinas e são expressos não somente via ativação de IFNAR mas também na presença de agonistas de TLR como LPS e DNA CpG. SOCS 1 e 3 bloqueiam atividade quinase de JAK impedindo assim a fosforilação de STAT (AKHTAR; BENVENISTE, 2011) e podem ainda bloquear a ativação de TLRs via bloqueio de Myd88 e NF-kB (NAKAGAWA et al., 2002) (Fig. 4B). **Figura 4. Vias de sinalização dos receptores TAM.**



A ativação dos receptores TAM pode levar ao disparo de duas vias distintas. (A) Ativação de Akt que culmina na proliferação celular, sobrevivência e fagocitose. (B) Quando acoplado a cadeira R1 de IFNAR ativa a translocação de dímeros de STAT 1 para o núcleo e transcrição de gene supressores da resposta imune. Todos esses mecanismos podem favorecer a infecção FONTE: Adaptado de (LEMKE, 2013).

Muito interessantemente, foi sugerido que além da indução de SOCS, a ativação do híbrido MERTK-IFNAR pode auxiliar no mecanismo de reestruturação do citoesqueleto, via Rac-1 e, nesse sentido, atuar no fortalecimento das junções de oclusão presentes na barreira hematoencefálica impedindo a passagem de WNV para o cérebro (MINER et al., 2015). No mesmo artigo níveis de citocinas elevados foram identificados no soro dos animais AxI^{-/-} e Mertk^{-/-} o que corrobora com a ideia de que TAM são potentes inibidores da resposta imune via SOCS. Durante infecções virais, SOCS3 foi descrito por auxiliar no desenvolvimento de infecções por HIV por inibir a sinalização de IFNARI levando ao aumento da replicação do vírus em macrófagos (CHENG et al., 2009). Corroborando esses achados, a deficiência de SOCS 1 leva à diminuição da replicação viral na infecção de células HepG2 e de linfócitos periféricos por HCV (BODE, 2003; PERSICO et al., 2007).

Da mesma forma, na infecção de flavivirus, TAMs têm importante papel, como verificado por Meertens *et al.* (2012) na infecção por DENV em células de rim humano (239T). Observou-se que a presença de Gas6 foi capaz de induzir o aumento da internalização viral na presença de AxI com domínios tirosina quinase íntegros. Pros1 também foi elencada como relevante na entrada de partículas de pseudovírus em células endoteliais (MORIZONO et al., 2011a). Pensando nas vias de sinalização

ativadas e seus desdobramentos, os receptores TAM parecem ser cruciais, uma vez que levam à sobrevivência celular, à proliferação e a importante imunossupressão, tornando as células que expressam TAM um abrigo perfeito para a replicação viral.

1.4.1 Receptores TAM e infecção por ZIKV

O envolvimento dos receptores TAM na infecção por ZIKV foi inicialmente descrito por Hamel *et al* (2015) que apontaram o envolvimento de Tyro3 e Axl na entrada do ZIKV em fibroblastos e queratinócitos de pele humana. Posteriormente, muitos estudos evidenciaram o papel dos receptores TAM no curso da infecção por ZIKV. A diminuição da infecção foi demonstrada *in vitro* pelo bloqueio da porção tirosina quinase de Axl por R428 (LIU et al., 2016b; MEERTENS et al., 2017) e pela utilização de um sgRNA (do inglês: *single-guide RNA*) e siRNA (do inglês: *small interfering RNA*) dirigidos contra o receptor (RICHARD et al., 2017). Como já mencionado acerca de outras infecções, Axl pode levar a supressão da resposta IFN do tipo I durante a infecção por ZIKV em astrócitos primários (CHEN et al., 2018). Corroborando esses achados, foi verificado que após infecção por HSV-2 na placenta ocorre aumento da expressão dos receptores TAM, em especial Mertk, levando à diminuição da resposta de IFN tipo I, aumento da infecção por ZIKV e ainda aumento da apoptose de células do trofoblasto (ALDO et al., 2016).

Um estudo ainda mais recente identificou aumento da sobrevida de camundongos Ifnar^{-/-} AxI^{-/-}, diminuição da apoptose de células da microglia, diminuição na liberação de IL-1β e consequente melhora do quadro geral da infecção (HASTINGS et al., 2019), demonstrando papel de AxI independente da regulação da via de IFN. Esses dados ressaltam o papel de AxI mais como um modulador da resposta do que como um mero componente na internalização das partículas virais.

Embora muitos artigos tenham evidenciado o papel dos receptores TAM na infecção por ZIKV, intrigantemente, alguns apresentaram resultados opostos (HASTINGS et al., 2017; WELLS et al., 2016a). Por exemplo, abordagens experimentais *in vivo* demonstraram que a replicação viral no testículo é independente da expressão de AxI (MA et al., 2017). Corroborando isso, a panuveíte e o dano retiniano causados pelo vírus também foram independentes na expressão de AxI e Mertk (MINER et al., 2016b). Mais surpreendente, animais deficientes para TAM não apresentaram diferenças quanto à viremia, carga viral tecidual e patologia cerebral, mesmo com diferentes vias de infecção (LI et al., 2017). Entretanto, tais estudos não podem levar ao negligenciamento da função destes receptores no curso da infecção.

Talvez este papel esteja mais voltado para modulação da resposta imune do que na internalização de partículas em sí. Vale destacar também que papel dos ligantes Gas6 e Pros1 em estudos *in vivo* ainda não foi elucidado.

1.5 Susceptibilidade à infecção

Levando em consideração que 80% da população adulta infectada com ZIKV não desenvolve sintomas (PETERSEN et al., 2016) e que apenas 6-12% das mães infectadas por ZIKV podem dar origem a fetos afetados (FRANÇA et al., 2016), é justo pensar que diversos componentes moleculares podem estar envolvidos na susceptibilidade à doença. É cabível ainda pensar que esses fatores estão relacionados ao sistema imune, sua modulação e/ou receptores de internalização viral, e que esses podem ser modulados e expressos de maneira diferente entre os indivíduos frente a infecção.

De fato, modelos murinos utilizados nos estudos da síndrome congênita são na maioria deficientes da resposta de IFN do tipo I (LAZEAR et al., 2016; MINER et al., 2016a; YOCKEY et al., 2016). O que confirma a necessidade de resposta antiviral prejudicada para o estabelecimento da infecção congênita. De maneira interessante, Cugola *et al* (2016) identificaram que NPCs expressam altas quantidades de AxI e são mais susceptíveis à morte gerada pela infecção por ZIKV. Em contrapartida, neurônios expressam menores níveis de AxI e são menos susceptiveis a morte gerada pela infecção. Deveras, tais dados evidenciam mecanismos intrínsecos individuais que podem afetar a infecção no cérebro de fetos, como sugerido por Caires-Júnior *et al* (2018). O grupo indicou que possíveis variações em regiões reguladoras dos genes poderiam levar a alterações epigenéticas e que estas podem ser a chave para o sucesso da infecção por ZIKV em fetos. Tais variações, poderiam por exemplo, culminar em diferentes níveis de expressão de moléculas da resposta antiviral além dos receptores TAM.

Pensando nisso, a hipótese deste trabalho é de que a susceptibilidade à infecção por ZIKV esteja também relacionada a uma maior expressão de receptores TAM e Gas6 em camundongos SJL susceptíveis a infecção congênita por ZIKV, diferentemente de animais C57BL/6 resistentes (CUGOLA et al., 2016b). Confirmando estes resultados, outros estudos já demonstraram diferenças entre as linhagens frente a infecções virais no sistema nervoso central (CHEN et al., 1995; LIBBEY et al., 2008; STEWART et al., 2009). Comparações entre linhagens podem ajudar a compreender melhor a relevância dos receptores TAM na infecção por ZIKV em diferentes

indivíduos, e talvez desvendar a base da patogênese da microcefalia causada pelo ZIKV na linhagem SJL. Sendo assim, neste trabalho estudamos a relevância dos receptores TAM e seu ligante solúvel Gas6 na infecção por ZIKV em camundongos SJL e C57BL/6.

2. OBJETIVO

Avaliar a correlação entre os receptores TAM e seu ligante Gas6 na infecção por ZIKV assim como na susceptibilidade à transmissão vertical em camundongos resistentes C57BL/6 e susceptíveis SJL.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar em células dendríticas e macrófagos, a liberação de Gas6 e replicação viral após a infecção com ZIKV na presença de rmGas6 (Gas6 recombinante murino);
- Avaliar a carga viral e expressão gênica no baço e soro de camundongos SJL e C57BL/6 infectados com ZIKV pré-incubado ou não com rmGas6 e tratados com R428;
- Avaliar o papel de Gas6 na infecção subcutânea e intravaginal de prenhes C57BL/6;
- 4. Avaliar carga viral no olho e cérebro de neonatos C57BL/6 após infecção intracranioventricular (ICV).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e Manutenção do ZIKV

Os vírus utilizados foram as cepas BeH815744 e PE243, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Akiko Iwasaki.

3.1.1 Propagação em células Vero

As células Vero foram mantidas a 37°C com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina, quando atingiram a confluência de 70% o sobrenadante contendo vírus (PE243) foi adicionado à cultura e mantido por 1h na estufa. Após esse período foram adicionados à garrafa 45mL de meio DMEM com 2% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina. As células foram mantidas na incubadora até que o efeito citopático fosse observado (aproximadamente 3 dias). Nesse momento o sobrenadante contendo o vírus foi coletado, congelado e titulado em células Vero pela técnica de unidades formadoras de placa (PFU, do inglês: *plaque forming unit*). O vírus foi utilizado nos experimentos *in vitro*.

3.1.2 Propagação em células C6/36

As células C6/36 foram mantidas a 26 °C em meio L-15 com 10% de SFB e 1% Penicilina/Estreptomicina. Quando as células atingiram a confluência de 70% o vírus (BeH815744), na passagem T4, foi adicionado à cultura e mantido por 1h na estufa de 26 °C. Após o período de incubação foram adicionados à garrafa 45mL de meio L-15 com 2% de SFB e 1% Penicilina/Estreptomicina. As células foram mantidas a 26 °C até que o efeito citopático fosse observado (Aproximadamente 5 dias). O sobrenadante da cultura foi coletado e a ele foi adicionado PEG (poletilenoglicol) 50% na proporção de 1:4, essa mistura foi incubada 18h a 4°C. No dia seguinte, o tubo contendo PEG + Sobrenadante foi centrifugado (30' a 3200 g, 4°C), posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido na seguinte proporção: a cada 10mL de cultura inicial 100µL de HEPES 25Mm+DMEM. O vírus precipitado foi coletado, congelado e titulado em células Vero por PFU.

O vírus foi incubados ou não com rmGas6 (Gas6 recombinante de camundongo) (1µg/mL) (RD systems) por 4 horas a 37°C segundo protocolo de Morizono *et. al.* (2011) e utilizado posteriormente nos ensaios de infecção *in vivo*.

3.2 Ensaio de formação de placa

Células Vero (1 x 10⁵/poço), distribuídas em placas de 24 poços, foram infectadas com sobrenadante proveniente dos experimentos de infecção com macrófagos. O sobrenadante foi diluído (10¹-10⁵) em meio DMEM puro e usado para infectar células Vero por 1h a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e meio DMEM (2% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina) + CMC (Carboximetilcelulose) foi adicionado. As células foram cultivadas a 37°C durante 5 dias, depois coradas com cristal violeta. As placas foram contadas e o título viral da amostra foi determinado a partir da fórmula abaixo.

PFU/mL = <u>Média das placas</u> D x V

D = Diluição;

V = Volume do inóculo.

3.3 Diferenciação de células derivadas de Medula Óssea

Para obtenção das células da medula óssea, fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 WT e Axl-/- (mantidos no Yale Animal Resource Center) foram retirados e as células da medula óssea obtidas a partir do lavado da medula com 1 mL de meio RPMI completo (10% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina). As células retiradas foram centrifugadas (450g por 5 min) e ao pellet foi adicionado 1 mL de tampão de hemólise (composto de 150mM de NH4CI, 10mM de NaHCO3 e 0,1mM de EDTA). O volume foi completado com 9 mL de solução salina (PBS) e centrifugado novamente (450g por 5 min). O pellet foi ressuspendido em 1 mL de PBS e as células contadas. Para diferenciação de macrófagos, 1 x 107 células foram diluídas em 10 mL de meio RPMI completo, suplementado com 20ng/mL de M-CSF e transferidas para a placa de petri (100mm). As células permaneceram em estufa a (37°C e 5% de CO₂) durante 7 dias para completa diferenciação. No dia 4, foram adicionados mais 10mL de meio RPMI completo contendo 50ng/mL de M-CSF, no dia 7 as células foram utilizadas nos experimentos. Para diferenciação de células dendríticas, 1 x 10⁷ células foram diluídas em 10 mL meio RPMI completo contendo 20ng/mL de GM-CSF transferidas para a placa de petri (100mm). No dia 3, mais 10 mL de meio RPMI completo contendo 20ng/mL de GM-CSF, no dia 7 as células foram utilizadas nos experimentos.

3.4 Infecção in vitro

Após a diferenciação, as células foram distribuídas em placas de 6 poços na densidade de 5×10⁵ células/poço e infectadas com diferentes MOIs (do inglês: *multiplicity of infection*) de ZIKV, variando de 0,1 a 10. As células foram incubadas com partículas virais e rmGas6 (5nM), simultâneamente, a 37°C por 1h. Após a infecção, os sobrenadantes foram removidos e as células lavadas com PBS para remover as partículas virais remanescentes e em seguida foi adicionado meio RPMI completo. Análises de PFU, PCR quantitativo (qPCR) e ELISA foram realizadas após 24, 48 e 72 horas após a infecção.

3.5 ELISA para detecção de Gas6

Soro proveniente dos experimentos in vivo, descritos a seguir, e sobrenadantes dos experimentos com macrófagos e células dendríticas foram coletados e diluídos para avaliação da concentração de Gas6. O anticorpo de captura (0,5 mg/mL - #AF986) foi incubado numa placa de 96 poços por 18h à temperatura ambiente (TA). Em seguida, cada poço foi aspirado e lavado com tampão de lavagem (Tween® 20 a 0,05% em PBS, pH 7,2-7,4) 3 vezes. As placas foram então bloqueadas com BSA a 1% durante 1h à TA. As placas foram lavadas novamente, como descrito. Após as lavagens, 100uL de cada amostra foram adicionados e incubados durante 2h temperatura ambiente. A aspiração e lavagem foram repetidas e o anticorpo de detecção foi adicionado (1:200) e incubado durante 2h à TA. Aspiração e lavagem foram feitas novamente e 50uL de estreptavidina-HRP (1:250) foram adicionados e incubados durante 20 min à TA no escuro. Aspiração e lavagem foram realizadas e 50µL de substrato foram adicionados e incubados por 20 min no escuro. Em seguida, foram adicionados 25 µl de solução de parada (HCl). A leitura da densidade óptica foi realizada imediatamente a 450 nm e a concentração foi determinada de acordo com a curva padrão.

3.6 Experimentos *in vivo*

Foram utilizados camundongos SJL e C57BL/6 mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais eram machos e fêmeas com 6-8 semanas de idade mantidos em microisoladores (contendo no máximo 5 animais). Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos estão aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-63/2016) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Animais adultos foram infectados por via intravenosa (retrorbital) com ZIKV (10² pfu) a infecção foi realizada com ZIKV puro ou previamente incubado com rmGas6 e tratados ou não com R428 (80mg/Kg). A administração do fármaco foi realizada por gavagem (200uL) 1 dia antes da infecção e todos os dias até o final do experimento. Órgãos foram coletados nos dias 1, 3 e 5 após a infecção e analisados quanto à presença de vírus por qPCR.

Para os modelos de infecção em prenhes, fêmeas da linhagem C57BL/6 com 6-8 semanas de idade foram infectadas no 16º dia após a concepção (dpc) com ZIKV (10⁵ pfu) puro ou previamente incubado com Gas6 por via subcutânea. A eutanásia e coleta de todos os órgãos foi realizada no 18º dpc e 4 dias após o nascimento. As análises de RNA viral foram realizadas no baço e na placenta dos animais eutanaziados no 18º dpc e 4 dias de vida.

A infecção intravaginal foi realizada com ZIKV (10⁵ pfu) após a remoção do muco vaginal com swab. Foram injetados 25uL de vírus no 10^o dpc e os animais eutanaziados no 18^o dpc. A infecção intracranioventricular em neonatos foi realizada no lobo direito com 5uL de ZIKV (25pfu) 1 dia após o nascimento, a carga viral no olho e cérebro foi avaliada 1 dia após a infecção por qPCR.

3.7 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

O mRNA dos órgãos foi extraído após a homogeneização de tecidos (Polytron®) pela adição de 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, EUA) durante 5 min a T.A. A essa solução foram adicionados 500 µL de clorofórmio que promoveram a separação de RNA, DNA e proteínas, após centrifugação a 12000 rcf por 15 min. A porção superior (transparente, que contém RNA) foi cuidadosamente retirada e transferida para outro tubo onde foram adicionados 500 µL de isopropanol. A mistura foi mantida a T.A. por 10 min. Em seguida, centrifugada a 12000 rcf por 15min. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Ao *pellet* obtido, foi adicionado 1 mL etanol 75% e centrifugado a 7600 rcf por 5 min 4°C, o processo foi repetido 3 vezes. Por fim, o etanol foi retirado e o tubo mantido invertido sobre a bancada até a secagem do *pellet.* Finalmente, o RNA foi eluído com água ultrapura. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260nm. Para a síntese de cDNA, foi realizada uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 1,0 µg de RNA diluídos em 10 µL foram adicionados a 10 µL de mix (2 µL RT

buffer, 2 μ L de RT random primers, 1 μ L de multscribe e 0,8 μ L de dNTPs e 4,2 μ L de água ultrapura). A mistura foi levada ao termociclador e submetida a três ciclos (25 °C por 10min; 37 °C por 120 min; e 85 °C por 5min).

3.8 Quantificação por PCR em Tempo Real

A partir do cDNA obtido, foi avaliada a expressão de mRNA em células infectadas por PCR em tempo real (qPCR). A cada reação de PCR, foi adicionado 1µL de *20x TaqMan® gene expression assay*, 10 µL de *2x TaqMan® gene expression assay master mix*, 5 µL de amostra de cDNA e 4 µL de água ultrapura. As soluções foram levadas ao aparelho *QuantoStudio 3* e submetidas a diferentes estágios (**1**, 50 °C por 2 min; **2**, 95 °C por 2 min; **3**, 95 °C por 15seg e 60 °C por 1 min x 40 repetições). As curvas foram normalizadas pela expressão da Beta actina. A expressão gênica será dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) – ΔCt (calibrador), e ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo, as análises foram realizadas por *QuantStudio*TM *design na analisys software*.

Actb	Mm00607939_g1 FAM
Tyro3	Mm00444547_m1 FAM
Axl	Mm00437221_m1 FAM
Mertk	Mm00434920_m1 FAM
Socs3	Mm01249143_g1 FAM
lsg15	Mm01705338_s1 FAM
Oas2	Mm00460961_m1 FAM
lfit1	Mm00515153_m1 FAM
Gas6	Mm00490378_m1 FAM
Pros1	Mm01343426_m1 FAM

Os primers utilizados foram:

Para qPCR do vírus foi utilizado primer específico para ZIKV (1086/1162c/1107-FAM). A quantificação foi realizada a partir de uma diluição seriada (10¹⁰ - 10³) de uma amostra contendo ZIKV a fim de obter uma curva padrão com concentrações conhecidas do vírus. A curva obtida foi utilizada para comparação entre o CT (do inglês: *threshold cycle*) de cada amostra e o CT obtido por cada ponto da curva a fim de determinar a quantidade de cópias virais, mediante uma amostra na qual a concentração já é conhecida. As análises foram realizadas por *QuantStudio*™ *design na analisys software*.

3.9 Análise Estatística

As diferenças entre as médias dos resultados que foram obtidos nos experimentos foram determinadas pelo teste *t* student ou análise de variância (ANOVA) dependendo do número de variáveis. Foi estabelecido como nível mínimo de significância p < 0,05. A significância das análises foi representada por * p < 0,05** p < 0,005; *** p < 0,0005.

4. RESULTADOS OBTIDOS

4.1 Ausência de AxI não afeta a infecção de células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea.

No sentido de avaliar o papel de Axl e Gas6 como uma ponte na internalização do vírus nas células alvo, utilizamos macrófagos e células dendríticas derivadas da medula óssea de animais C57BL/6 WT ou Axl^{-/-}. As infecções *in vitro* foram realizadas com ZIKV ou ZIKV+rmGas6. A presença do vírus foi avaliada por qPCR em ambas populações celulares e por PFU no sobrenadante dos macrófagos. Em nossos resultados, a ausência de Axl não foi suficiente para impedir a infecção ou diminuí-la. Tanto em macrófagos como em dendríticas (Fig 5A e 5B) a presença de rmGas6 também não foi relevante para a infecção. Entre 24h e 72h houve diminuição da presença de partículas virais viáveis (PFU) no sobrenadante de macrófagos, porém, sem diferença entre os grupos (Fig 5C).

Figura 5. O eixo Axl-Gas6 é dispensável na infecção de células dendríticas e macrófagos in vitro.



Células dendríticas e macrófagos foram infectados com ZIKV PE243 (MOI 1) puro ou incubado com rmGas6 (5nM). A carga viral foi analisada por qPCR em macrófagos (A) e células dendríticas (B). PFU foi avaliado apenas no sobrenandante de culturas de macrófagos (C). hpi: horas após a infecção.

Já é sabido que a expressão de Axl e Gas6 é induzida por IFN-α, potente citocina anti-viral induzida durante infecções, em células dendríticas derivadas e

sangue periférico (PAUS et al., 2009). Sendo assim, avaliamos se a infecção por ZIKV é capaz de induzir a liberação de Gas6 durante os ensaios *in vitro*. Para isso, realizamos ELISA para detecção de Gas6 no sobrenadante das culturas de macrófagos e dendríticas. Interessantemente, não encontramos nenhuma diferença nas concentrações de Gas6 tanto em macrófagos (Fig 6B) quanto em células dendríticas (Fig 6A) até mesmo quando diferentes MOIs foram utilizados (Fig 6C).

Figura 6. Infecção por ZIKV não induz a liberação de Gas6 em culturas de células dendríticas e macrófagos.



Células dendríticas e macrófagos foram infectados com ZIKV PE243 (MOI 1) (A e B) ou diferentes MOIs (C). A infecção foi realizada com ZIKV puro. A concentração de Gas6 foi avaliada por ELISA do sobrenadante das culturas.

4.2 Gas6 possui papel na infecção por ZIKV em camundongos SJL e C57BL/6.

Para verificar se a presença rmGas6 poderia potencializar a infecção *in vivo,* analisamos a presença de cópias virais no baço e no soro de animais SJL e C57BL/6 (Fig. 7). Após um dia da infecção, a presença de rmGas6 resultou em aumento das cópias virais no soro e no baço de ambas as linhagens, enquanto que o tratamento com R428 não promoveu alterações (Fig. 7A e 7B). Apesar disso, após 3 dias, a diferença não foi mais visível (Fig 7A). Provavelmente pela produção de IFN tipo I o que levou a diminuição da carga viral.

Equiparamos também a presença de cópias virais entre as linhagens nos grupos infectados com ZIKV puro ou ZIKV+rmGas6. Verificamos que quando ambas as linhagens são infectadas com ZIKV puro não existe diferença quanto a carga viral, entretanto, quando utilizamos ZIKV previamente incubado com rmGas6 houve maior quantidade de cópias virais no baço de animais SJL um e três dias após a infecção (Fig. 7C)



Figura 7. Gas6 aumenta o número de cópias virais no baço e no soro 1dpi

Camundongos SJL e C57BL/6 foram tratados ou não com R428 e infectados com Zika vírus BeH815744 (10² pfu) puro ou previamente incubado com rmGas6 (1µg/mL). O soro foi analisado 1 dia após a infecção apenas nas amostras de ZIKV e ZIKV+rmGas6. 1, 3 e 5 dias após a infecção os baços foram retirados e analisados por qPCR. A quantidade de cópias virais foi calculada segundo protocolo descrito. A análise estatística realizada foi two-way ANOVA, nas figuras A e C e *t*-teste na figura B, onde * p < 0,05** p < 0,005.

Nossos dados corroboram os de Cugola *et al* (2016) nos quais a linhagem SJL se mostrou mais susceptível a infecção. Posteriormente, decidimos avaliar se a presença do vírus é capaz de induzir o aumento da concentração de Gas6 plasmático e ainda se o fármaco R428 é capaz de inibir possível aumento. Observamos, entretanto, que não há aumento da liberação de Gas6 na circulação em nenhum dos tempos analisados, independentemente da linhagem de camundongos e do tratamento com o fármaco, mesmo após três dias de infecção (pico da carga viral no baço) (Fig 8).





Camundongos SJL e C57BL/6 foram tratados ou não com R428 e infectados com Zika vírus BeH815744 (10² pfu) puro. O soro dos animais foi coletado 1, 3 e 5 dias após a infecção. A concentração de Gas6 foi avaliada por ensaio de ELISA.

Com estes resultados, concluímos que rmGas6 pode aumentar a infecção *in vivo*, ao passo que a infecção intravenosa não induz o aumento de Gas6 circulante. Seguimos então para avaliação da expressão gênica dos receptores TAM. As análises foram realizadas no baço após um dia da infecção pois nesse período foram verificadas as maiores diferenças na quantidade de cópias virais entre os grupos experimentais.

4.3 A infecção por ZIKV não modula a expressão dos receptores TAM e seus ligantes.

No sentido de avaliar se a presença de ZIKV poderia modular a expressão dos genes que codificam os receptores TAM, Gas6, Pros1 e Socs3 (envolvido na sinalização imunossupressora de TAM), realizamos qPCR com análise baseada na expressão das amostras sem infecção (*fold change*). A infecção intravenosa, tanto na presença quanto na ausência de rmGas6, não induz a expressão esplênica de nenhum dos genes analisados (Fig 9).



Figura 9. ZIKV não induz a expressão gênica de TAM, Gas6, Pros1 e Socs3.

Camundongos SJL e C57BL/6 foram tratados ou não com R428 e infectados com Zika vírus BeH815744 (10² pfu) puro ou previamente incubado com rmGas6 (1µg/mL). Um dia após a infecção os baços foram retirados e analisados por qPCR. A expressão gênica foi relativa à expressão da β-actina e as análises de fold change são em relação ao controle sem infecção.

4.5 A linhagem SJL expressa maiores quantidades de *Tyro3*, Axl e Mertk após a infecção por ZIKV

Para verificar se a melhor resposta frente a infecção com rmGas6 de SJL seria devido a diferenças na expressão dos receptores, comparamos a expressão gênica entre as linhagens antes (controle) e depois da infecção. Verificamos que os níveis de expressão de *Tyro3* em SJL são maiores que em C57BL/6 o que se mantém mesmo após a infecção com ZIKV. Por outro lado, *Axl* e *Gas6* são mais expressos em SJL somente após a infecção com ZIKV. Camundongos C57BL/6 apresentaram elevada expressão apenas de *Mertk* nas amostras controle, sendo que esta se igualou à

expressão em SJL após a infecção. Essas diferenças não se estendem para expressão dos ligantes (Fig. 10).



Figura 10. SJL expressa mais Tyro3, Axl e Gas6 depois da infecção em comparação à C57BL/6.

Camundongos SJL e C57BL/6 foram infectados com Zika vírus BeH815744 (10² pfu) puro. A análise foi realizada 1 dia após a infecção em ambas as linhagens. A comparação da expressão gênica dos baço foi realizada com base na expressão relativa à β -actina de cada linhagem. Os resultados foram analisados por *t*-teste onde * p < 0,05** p < 0,005; *** p < 0,0005

4.5 A infecção por ZIKV+rmGas6 induz a expressão de ISGs na linhagem SJL.

Sabe-se que receptores TAM podem suprimir a resposta de interferons do tipo I via SOCS. Por conta disso, decidimos avaliar a resposta imune antiviral a partir de ISGs. Para isso, realizamos qPCR e análises da expressão relativa em animais SJL e C57BL/6 um dia após infecção. Nestes experimentos demonstramos aumento de *Isg15* e *Ifit1* na linhagem SJL nos grupos infectados ZIKV+rmGas6, enquanto que, surpreendentemente, nenhuma diferença foi detectada em C57BL/6 (Fig. 11).



Figura 11. Linhagem SJL expressa mais genes induzidos por IFN após infecção com ZIKV+rmGas6.

Camundongos SJL e C57BL/6 foram tratados ou não com R428 e infectados com Zika vírus BeH815744 (10² pfu) puro ou previamente incubado com rmGas6 (1µg/mL). 1 dia após a infecção os baços foram retirados e analisados por qPCR. A expressão gênica foi relativa à expressão da β-actina e as análises de fold change são em relação ao controle sem infecção. A análise estatística realizada foi two-way ANOVA onde * p < 0,05 e ** p < 0,005.

4.6 rmGas6 torna animais C57BL/6 susceptíveis ao desenvolvimento de malformações congênitas após infecção por ZIKV.

Sabendo que a infecção por ZIKV pré-incubado com rmGas6 pode aumentar a infecção no baço de animais adultos, nos perguntamos se esta molécula poderia afetar também a transmissão congênita em animais C57BL/6 resistentes. Para tanto, infectamos fêmeas prenhes da linhagem C57BL/6 com ZIKV+rmGas6 ou ZIKV puro. Os baços dos fetos provenientes foram avaliados por qPCR. Verificamos a presença de 54,5% de fetos afetados na presença de ZIKV puro, enquanto fetos de mães infectadas com ZIKV+rmGas6 atingiram a porcentagem de 42,8% (Fig 12B). A placenta também foi analisada, e verificamos a presença de cópias virais em 21,4% dos filhotes cujas mães foram infectadas com rmGas6, porcentagem muito similar a placenta de filhotes provenientes de mães infectadas com ZIKV puro, que foi de 18,2% (Fig 12C).

Realizamos também a infecção intravaginal com objetivo de avaliar se a ação dos receptores TAM poderia estar relacionada a expressão destes na placenta. Verificamos que após infecção intravaginal, fetos provenientes de mãe infectada apenas com ZIKV não apresentam carga viral no baço, entretanto, animais cuja mãe foi infectada com ZIKV+rmGas6 apresentam RNA viral no baço o que pode evidenciar o papel local de Gas6 e TAM na placenta (Fig. 12D).

Figura 12. Infecção por ZIKV previamente incubado com rmGas6 torna C57BL/6 suscetível ao desenvolvimento de síndrome congênita.







	ZIKV	ZIKV+Gas6
Infectados	7	6
Não Infectados	5	8
% Infectados	54,5	42,8

	ZIKV	ZIKV+Gas6
Infectados	2	3
Não Infectados	11	14
% Infectados	18,2	21,4



Camundongos prenhes foram infectadas com ZIKV previamente incubado ou não com Gas6 no 16º dpc com 10⁵ pfu por via subcutânea (A, B e C) ou no 10ºdpc por via intravaginal (D). O baço e a placenta foram coletados no 18^e dia de gestação e analisados por qPCR.

Avaliamos também como a infecção na presença de rmGas6 poderia se correlacionar às alterações macroscópicas nos fetos. Para isso realizamos as análises 4 dias após o nascimento, momento em que as diferenças de tamanho são mais evidentes. Embora a infecção com rmGas6 não leve a maior carga viral tanto 18º dpc (Fig. 12B e 12C) quanto 4 dias após o nascimento (Fig 13A), verificamos que estes quando provenientes de mãe infectada com ZIKV+rmGas6 apresentaram alterações fenotípicas. São essas: menor comprimento da cabeça, distância biparietal e peso em comparação aos fetos cujas mães foram infectadas com ZIKV puro (Fig. 13B). Esses dados podem demonstrar papel de Gas6 relacionado ao prejuízo no desenvolvimento fetal.





Camundongos prenhes foram infectadas com ZIKV (10⁵ pfu por via subcutânea) previamente tratado ou não com rmGas6 no 16² dia de gestação. As análises da carga viral e fotografia e as medidas foram realizadas 4 dias após o nascimento.

É importante ressaltar que o vírus não foi encontrado no cérebro dos animais em nenhum dos experimentos de infecção congênita realizados (dados não mostrados). Por conta disso, decidimos avaliar se rmGas6 teria alguma função na infecção direta no cérebro de neonatos. Os resultados demonstram que Gas6 não possui função na infecção intracranioventricular (Fig. 14) de animais neonatos (1 dia de vida). Tal fato ressalta o importante papel na passagem transplacentária do vírus mais do que o potencial em auxiliar na infecção de células do cérebro per se.





Neonatos (P1) foram infectados com ZIKV puro (25 pfu) ou previamente incubado com rmGas6 por via ICV. Olhos e cérebros foram coletados 1 dia após a infecção.

5. DISCUSSÃO

O envolvimento dos receptores TAM na infecção por ZIKV foi inicialmente descrito por Hamel et al. (2015). Nesse artigo, o grupo apresentou os receptores TAM como um dos principais requisitos para a infecção por ZIKV em fibroblastos humanos e células dendríticas por meio da utilização de anticorpos e siRNA dirigidos contra AxI. Muitos estudos corroboraram os resultados de Hamel (MEERTENS et al., 2017; TABATA et al., 2016; RICHARD et al., 2017 LIU et al., 2016; MUKHERJEE; WILHELM; ANTONIADES, 2016; RETALLACK et al., 2016; ZHAO et al., 2017) e, juntos, estabeleceram os receptores TAM como importantes candidatos para entrada do ZIKV nas células alvo. Embora o nocaute de AxI pela tecnologia CRISPR em diferentes linhagens celulares humanas leve a uma diminuição da infecção in vitro (LIU et al., 2016b; MEERTENS et al., 2012b; RETALLACK et al., 2016), contra intuitivamente, alguns estudos descreveram que este receptor é dispensável para infecção por ZIKV tanto in vitro (WELLS et al., 2016a) quanto in vivo (HASTINGS et al., 2017; MINER et al., 2016c) trazendo grande controvérsia sobre a relevância dos receptores TAM na infecção por ZIKV. Para contribuir nesse campo, o presente trabalho deu foco ao ligante Gas6 e tentou entender com mais detalhes qual o papel dessa molécula na infecção, o que tem sido negligenciado na maior parte dos estudos.

Demonstramos que Axl não é essencial para a infecção por ZIKV *in vitro* em células dendríticas e macrófagos, mesmo na presença de Gas6 exógeno (Fig. 5). Além disso, o vírus não induziu a liberação do ligante em nenhum dos tipos celulares (Fig. 6). Semelhantemente, Axl também é dispensável durante a infecção por ZIKV em NPCs humanas e organoides cerebrais (WELLS et al., 2016b) nos quais a ausência do receptor não protegeu da infecção ou da morte celular induzida por ZIKV. Em contrapartida, estudos que também utilizaram o ligante exógeno obtiveram outros resultados nos quais demonstraram que a presença de Gas6 leva à maior internalização de partículas virais (MEERTENS et al., 2017). Em relação a dispensabilidade dos TAM, algumas hipóteses são sugeridas: 1. exigência de outros receptores putativos de superfície celular para entrada viral, isto é, integrinas e receptores TIM como observado na infecção por ZIKV, DENV, JEV, e WNV (LAURETI et al., 2018); 2. importância dos receptores apenas em tipos específicos de células; 3. diferenças na resposta de interferon tipo I em camundongos x humanos.

Reforçando a ultima hipótese proposta, Grant *et al* (2016), observaram que o NS5 do ZIKV inibe a sinalização do interferon tipo I em células humanas, mas não de camundongos. De forma interessante, a NS5 de DENV (ASHOUR et al., 2009; MAZZON et al., 2009) e de JEV (BEST et al., 2005) também possuem tal potencial, o que para DENV também só foi descrito em linhagens celulares humanas. Como já detalhado, STAT2 é fundamental na via de sinalização de receptores de IFN do tipo I e é muito expresso em células da imunidade inata, como dendríticas e macrófagos. Dessa maneira, a ativação da via em células de camundongos que expressam importantes quantidades de IFNAR pode mascarar o papel dos receptores e assim prejudicar o esclarecimento da relevância de Axl na infecção por ZIKV.

Paradoxalmente, a inibição da resposta de IFN tipo I pode ser benéfica para o desenvolvimento de imunidade adaptativa antiviral. A presença de IFNs leva a diminuição de IL-1β, citocina requerida para primar células T antivirais (PANG; ICHINOHE; IWASAKI, 2013) além de ser importante na imunidade contra vírus de RNA como WNV (RAMOS et al., 2012). De fato, foi demonstrado por Schimid *et al* (2016) que Axl pode atuar na ativação de células dendríticas, que por sua vez primam células T durante a infecção por Influenza. Assim, Axl pode ter papel na proteção do hospedeiro frente infecções virais. Tendo isso em vista, Axl pode ter diferentes funções para imunidade inata x adaptativa, todavia nada ainda foi descrito nesse sentido na infecção por ZIKV.

Nossos dados *in vivo* evidenciaram que a infecção intravenosa na presença de rmGas6 eleva a carga viral no baço e no soro de animais C57BL/6 e SJL, em comparação a animais infectados com ZIKV puro (Fig. 7). Esses resultados confirmam a hipótese de que rmGas6 pode auxiliar a entrada do vírus nas células alvo, o que é corroborado por resultados *in vitro* obtidos com DENV (MEERTENS et al., 2012) e ZIKV (MEERTENS et al., 2017), nos quais também foi utilizada a proteína recombinante. Além disso, a linhagem de camundongos SJL apresentou maior quantidade de cópias virais na presença de rmGas6 em comparação a C57BL/6, confirmando achados do nosso grupo (CUGOLA et al., 2016a). Outros estudos também verificaram susceptibilidade da linhagem SJL na infecção por adenovirus tipo I (SPINDLER et al., 2001) e Theiler virus (STEWART et al., 2009).

Apesar dos resultados descritos anteriormente serem promissores, surpreendentemente, o tratamento com inibidor da porção tirosina quinase de Axl (R428) não promoveu alterações da carga viral no baço. Esse achado pode confirmar a irrelevância de Axl na infecção *in vivo*. Entretanto, vale lembrar que R428 não é um inibidor específico e pode agir em outras quinases. De encontro a esses dados, Meertens *et al* (2017) verificaram que o tratamento de células de microglia humanas com R428 culminou na diminuição da infecção. Contudo, dados obtidos demonstraram papel importante de Gas6 o que nos faz pensar que essa molécula possa ligar em outros receptores, porém essa hipótese é meramente especulativa pois nada é descrito na literatura.

A concentração plasmática de Gas6, também não apresentou diferenças após a infecção (Fig. 8). Estudos em humanos com vírus Hantaan, diferentemente dos nossos resultados, identificaram aumento da concentração plasmática de Gas6 após infecção, o que foi associado ao aumento da severidade da doença (ZHANG et al., 2017). Níveis plasmáticos elevados de Gas6 são associados também a casos de sepse e em outras doenças que envolvem inflamações sistêmicas (EKMAN et al., 2010). A infecção por ZIKV em células mononucleares de sangue periférico humanas gera produção de citocinas pró-inflamatórias, porém sem indução de IFNs tipo I (COLAVITA et al., 2018). Sem resposta efetiva de IFN, é possível que em humanos a expressão de Gas6 não seja alterada na infecção por ZIKV. Entretanto, sabe-se que a infecção em camundongos, especialmente C57BL/6, é bem controlada devido a boa resposta de IFN tipo I (LI et al., 2015a). Sabe-se também que essa citocina estimula a expressão de Gas6 em células dendríticas periféricas (PAUS et al., 2009). Dessa maneira não fica claro o motivo pelo qual os níveis plasmáticos de Gas6 não se apresentaram aumentados.

Verificamos também que a infecção por ZIKV não é capaz de induzir a expressão dos genes que codificam os receptores TAM e seus ligantes no baço um dia após a infecção. Em comparação, Zhang *et al* (2016) verificaram aumento da expressão de AxI após a infecção de NPCs (ZHANG et al., 2016b), demonstrando que ZIKV pode modular a expressão dos TAM em tipos celulares específicos. Quando comparamos a expressão relativa entre as linhagens, verificamos que *Tyro3* é mais expresso em SJL tanto na ausência quanto na presença de ZIKV. A*xI* e *Gas6* se apresentam mais expressos em SJL somente na presença de ZIKV. Esses dados se somam no sentido de comprovar o papel dos receptores TAM na suscetibilidade de SJL, já que esses animais expressam maiores quantidades dos receptores e seu ligante, podendo proporcionar ao vírus maior oferta de moléculas para invasão celular.

Tais dados podem esclarecer por que SJL é mais responsivo a infecção por ZIKV+rmGas6. Com base nesse dado, a regulação da expressão gênica em diferentes linhagens parece ser diferente frente às infecções e agravamento da doença. Tais variações podem ocorrer devido a multiplos fatores coordenados por alterações epigenéticas (WEBER-STADLBAUER, 2017). Ao encontro dessa hipótese, Caires-Júnior *et al* (2018) isolaram NPCs provenientes de gêmeos afetados ou não com microcefalia e observaram que o crescimento *in vitro* de ambos os doadores foi o mesmo. Diferenças se deram apenas quando as células foram infectadas com ZIKV, sugerindo que o gêmeo afetado não desenvolveria microcefalia na ausência do vírus(CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). Realmente, mudanças epigenéticas foram indicadas como pontos importantes na susceptiblidade à infecção, além do potencial do próprio virus em modular a metilação do DNA durante a infecção de organoides cerebrais (JANSSENS et al., 2018). No presente trabalho, nada foi testado quanto às alterações epigenéticas nas diferentes linhagens, mas com os dados obtidos abrem-se portas para tal investigação

Para verificar a responsividade de cada linhagem frente a infecção, realizamos a análise da expressão gênica de ISGs. SJL apresentou aumento de *Isg15* e *Ifit1* em amostras infectadas com ZIKV+rmGas6. Por outro lado, em C57BL/6 não houve aumento de nenhum dos genes analisados (Fig. 11). Tais dados são corroborados por estudos com vírus Theiler nos quais a expressão gênica dos ISGs também se apresentou aumentada em SJL em comparação com C57BL/6. Porém, a tradução dessas proteínas foi prejudicada em SJL, limitando sua função antiviral (LI et al., 2015b). Além disso, tal aumento pode estar meramente relacionado a ativação de sensores citoplasmáticos pela maior quantidade de RNA viral no baço 1 dia após a infecção em SJL (Fig 7C). Dessa maneira, não é possível afirmar que a resposta de ISGs observada será efetiva no papel antiviral.

Realizamos ensaios de infecção com rmGas6 em prenhes da linhagem C57BL/6, com o objetivo de verificar se a presença de Gas6 exógeno seria capaz de gerar prole infectada e com malformações. Tabata *et al* (2016) demonstraram a expressão de AxI em células da decídua, de Hoffbauer, no trofoblasto e em fibroblastos da placenta humana, sugerindo a função do receptor na passagem transplacentária do vírus. Todavia, a correlação entre receptores TAM e Gas6 na susceptibilidade a síndrome congênita do ZIKV ainda não foi estabelecida.

Em nossos resultados, apesar da ausência de carga viral elevada nos fetos e neonatos provenientes de mães infectadas com ZIKV+rmGas6 (Fig. 12 e 13) estes apresentaram importantes diferenças fenotípicas relacionadas ao tamanho do crânio 13B). Curiosamente, camundongos deficiêntes pra Ifnar, apesar (Fig. de apresentarem maior carga viral, não possuem importantes alterações no desenvolvimento. Aqueles nos quais a resposta de IFN tipo I estava presente, apesar de menor carga viral, apresentaram apoptose do labirinto da placenta e hipoxia fetal (YOCKEY et al., 2018). No mesmo artigo, a injeção intraperitoneal de poli:IC em prenhes WT, importante agonista de TLR3, levou a reabsorção de todos os fetos de maneira, IFNAR-dependente. A ativação de TLR3 por ZIKV já foi descrita e pode causar morte de NPCs em organoides humanos (OJHA et al., 2019). A hipótese para nossos achados seria de que a imunocompetência descrita em animais C57BL/6 pode ser benéfica enquanto baixas quantidades de patógeno são administradas. Todavia se a carga viral é alta, como no caso da infecção com rmGas6, a resposta imune exacerbada poderia culminar em alterações prejudiciais ao desenvolvimento fetal

A presença de vírus no baço de fetos após infecção intravaginal com rmGas6 e a falta de diferenças na infecção ICV evidencia papel da proteína na passagem transplacentária do vírus mais do que seu potencial em auxiliar na infecção de células do cérebro per se.

Em suma, nossos dados corroboram os da literatura em dois pontos distintos. O primeiro deles na irrelevância dos TAM para infecção *in vitro* de células imunocompetentes. O segundo, no papel dos receptores dependente da presença de Gas6, principalmente na sindrome congênita. Apesar de mais experimentos serem necessários para esclarecer as hipótese propostas, estas direcionam o estudo dos TAM como fatores de susceptibilidade a infecção e ferramentas de internalização viral. Nossos dados podem contribuir para melhor compreensão dos mecanismos de resistência e susceptibilidade ao ZIKV, principalmente na patogênese da microcefalia.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que:

- A infecção em macrófagos e células dendríticas não é afetada pela presença de Gas6 exógeno, nem pela ausência de AxI e não induz aumento da concentração de Gas6 no sobrenadante;
- A carga viral no baço e no soro após a infecção por ZIKV em animais SJL e C57BL/6 aumenta na presença de rmGas6, entretanto, R428 não é capaz de reduzi-lá;
- A infecção intravenosa de SJL e C57BL/6 não induz o aumento da concentração de Gas6 no soro dos animais e não modula a expressão gênica de TAM e seus ligantes;
- SJL tem expressão de ISGs aumentada um dia após a infecção e expressa maior quantidade de *Tyro, AxI* e *Gas6*, em comparação a C57BL/6;
- A infecção de prenhes da linhagem C57BL/6 na presença de Gas6, leva ao desenvolvimento de malformações dos fetos;
- A infecção intravaginal com ZIKV+rmGas6 leva a detecção de ZIKV no baço dos fetos;
- A infecção ICV na presença de Gas6 não afeta a carga viral no cérebro e olho.

REFERÊNCIAS

AID, M. et al. Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 610–620.e14, 2017.

ALDO, P. et al. HSV-2 enhances ZIKV infection of the placenta and induces apoptosis in first-trimester trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 76, n. 5, p. 348–357, 1 nov. 2016.

ANDERSON, H. A. et al. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 87–91, 25 jan. 2003.

ASHOUR, J. et al. NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. **Journal of Virology**, v. 83, n. 11, p. 5408–5418, 1 jun. 2009.

BARBELANNE, M.; TSANG, W. Y. Molecular and Cellular Basis of Autosomal Recessive Primary Microcephaly. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, 1 jul. 2016.

BELLAN, M. et al. The Gas6/TAM System and Multiple Sclerosis. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 11, p. 1807, 28 out. 2016.

BEST, S. M. et al. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tickborne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. **Journal of virology**, v. 79, n. 20, p. 12828–39, 15 out. 2005.

BHATNAGAR, J. et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 405–414, mar. 2017.

BINDER, M. D.; KILPATRICK, T. J. TAM Receptor Signalling and Demyelination. **Neurosignals**, v. 17, n. 4, p. 277–287, 2009.

BOORMAN, J. P. .; PORTERFIELD, J. . A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of zika virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 238–242, 1 mar. 1956.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.

BRESSANELLI, S. et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pHinduced membrane fusion conformation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 4, p. 728–738, 25 fev. 2004.

BRIANT, L. et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, v. 464, p. 26–32, 2014.

BURSTYN-COHEN, T. TAM receptor signaling in development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 61, n. 3-4–5, p. 215–224, 2 jun. 2017.

BURSTYN-COHEN, T.; HEEB, M. J.; LEMKE, G. Lack of Protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 2942–2953, 1 out. 2009.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 475, 2 dez. 2018.

CARVALHO, M. D. C. G. et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2016.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 21 maio 2016.

CHEN, H.-H. et al. A picornaviral protein synthesized out of frame with the polyprotein plays a key role in a virus–induced immune–mediated demyelinating disease. **Nature Medicine**, v. 1, n. 9, p. 927–931, set. 1995.

CHEN, J. et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type i interferon signalling. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 302–309, 2018.

COLAVITA, F. et al. ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I, II, and III IFN Response in Human PBMC. 2018.

COULOMBIER, D. et al. RAPID RISK ASSESSMENT ECDC internal response team Internal experts in alphabetical order: External experts consulted and acknowledgements. 2015.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, p. 1–15, 2016a.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 9 jun. 2016b.

DAVIDSON, A. et al. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 28, p. 716–717, 22 jul. 2016.

DEJARNAC, O. et al. TIM-1 Ubiquitination Mediates Dengue Virus Entry. **Cell Reports**, v. 23, n. 6, p. 1779–1793, maio 2018.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–20, set. 1952.

DIHINGIA, A.; KALITA, J.; MANNA, P. Implication of a novel Gla-containing protein, Gas6 in the pathogenesis of insulin resistance, impaired glucose homeostasis, and inflammation: A review. **Diabetes research and clinical practice**, v. 128, p. 74–82, 1 jun. 2017.

DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2 jun. 2016.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–43, 11 jun. 2009.

ECDC, E. C. FOR D. P. AND C. I. Zika virus transmission worldwide – 9 April 2019. **Ecdc**, n. April, 2019.

EKMAN, C. et al. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. **Critical care (London, England)**, v. 14, n. 4, p. R158, 2010.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepi- demiological investigations in Oyo State. **J. Hyg., Camb**, v. 83, 1979.

FOURCADE, C. et al. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 82, p. 1–4, 1 set. 2016.

FRANÇA, G. V. A. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891–897, 27 ago. 2016.

GAO, D. et al. Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: A Mathematical Modeling Analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28070, 17 set. 2016.

GORMAN, M. J. et al. An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 5, p. 672–685.e6, 9 maio 2018.

GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host & Microbe**, p. 882–890, 2016a.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.

HASTINGS, A. K. et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. **Cell Reports**, v. 19, n. 3, p. 558–568, 2017.

HASTINGS, A. K. et al. Loss of the TAM receptor Axl ameliorates severe Zika virus pathogenesis and reduces apoptosis in microglia. **iScience**, 2019.

HUANG, M. et al. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K– dependent proteins. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 9, p. 751–756, 17 set. 2003.

IKEJEZIE, J. et al. Zika Virus Transmission — Region of the Americas, May 15, 2015– December 15, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 12, p. 329–334, 31 mar. 2017.

JANSSENS, S. et al. Zika Virus Alters DNA Methylation of Neural Genes in an Organoid Model of the Developing Human Brain. **mSystems**, v. 3, n. 1, 2018.

JEMIELITY, S. et al. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine) TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. 2013a.

JEMIELITY, S. et al. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. v. 9, n. 3, 2013b.

KARIMI, O. et al. Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 939–940, 5 mar. 2016.

KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of

RNA viruses. Nature, v. 441, n. 7089, p. 101–105, 9 maio 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, n. 1, p. 1–20, 1 nov. 2008.

LAI, C.; LEMKE, G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. **Neuron**, v. 6, n. 5, p. 691–704, maio 1991.

LAURETI, M. et al. Flavivirus Receptors : Diversity , Identity , and Cell Entry. v. 9, n. September, p. 1–11, 2018.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis Cell Host & Microbe, Microbe Resource A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 1–11, 2016.

LEE, C.; LIAO, C.; LIN, Y. Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death. **Journal of virology**, v. 79, n. 3, p. 8388– 8399, 2005.

LI, F. et al. AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 3, p. e16, 2017.

LI, L. et al. Interferon-stimulated genes—essential antiviral effectors implicated in resistance to Theiler's virus-induced demyelinating disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 242, 24 dez. 2015a.

LIBBEY, J. E. et al. Seizures following picornavirus infection. **Epilepsia**, v. 49, n. 6, p. 1066–1074, 1 jun. 2008.

LINDA J. PIKE, *,‡ et al. Lipid Rafts Are Enriched in Arachidonic Acid and Plasmenylethanolamine and Their Composition Is Independent of Caveolin-1 Expression: A Quantitative Electrospray Ionization/Mass Spectrometric Analysis†. 2002.

LIU, S. et al. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. **Circulation Research**, v. 119, n. 11, p. 1183–1189, 2016b.

LUPTON, K. Zika virus disease: a public health emergency of international concern. **British Journal of Nursing**, v. 25, n. 4, 2016.

MA, W. et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice Article Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1511–1518.e10, [s.d.].

MA, W. et al. Erratum: Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice (Cell (2016) 167(6) (1511– 1524)(S0092867416315379)(10.1016/j.cell.2016.11.016)). **Cell**, v. 168, n. 3, p. 542, 2017.

MARTINES, R. B. et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 898–904, 2016.

MAZZON, M. et al. Dengue Virus NS5 Inhibits Interferon-α Signaling by Blocking Signal Transducer and Activator of Transcription 2 Phosphorylation. **The Journal of**

Infectious Diseases, v. 200, n. 8, p. 1261–1270, 15 out. 2009.

MCDONALD, E. M.; DUGGAL, N. K.; BRAULT, A. C. Pathogenesis and sexual transmission of Spondweni and Zika viruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005990, 2017.

MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. **Cell Host and Microbe**, v. 12, p. 544–557, 2012a.

MEERTENS, L. et al. AxI Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, v. 18, n. 2, p. 324–333, 2017.

MICHLMAYR, D. et al. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nature microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1462–1470, nov. 2017.

MINER, J. J. et al. The TAM receptor Mertk protects against neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity. **Nature medicine**, v. 21, n. 12, p. 1464–72, dez. 2015.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016a.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. **Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 3208–3218, 2016b.

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

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

MORIZONO, K. et al. The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase AxI to mediate viral entry. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 4, p. 286–98, 21 abr. 2011a.

MORIZONO, K.; CHEN, S. Y. Role of Phosphatidylserine Receptors in Enveloped Virus Infection. v. 88, n. 8, p. 4275–4290, 2014.

MOTTA, I. J. F. et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 11, p. 1101–1103, 15 set. 2016.

MUKHERJEE, S. K.; WILHELM, A.; ANTONIADES, C. G. TAM receptor tyrosine kinase function and the immunopathology of liver disease. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 11, p. G899–G905, 2016.

MUSSO, D. et al. Review Zika virus in French Polynesia 2013-14: anatomy of a completed outbreak. **www.thelancet.com/infection**, v. 18, 2018.

NAKAGAWA, R. et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 677–87, 1 nov. 2002.

OJHA, C. R. et al. Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0208543, 8 fev. 2019.

OLIVEIRA, L. G.; PERON, J. P. S. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. **Journal of Leukocyte Biology**, p. JLB.MR1118-460R, 7 maio 2019.

OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–93, 1981.

PAGANI, I. et al. Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. **Scientific Reports**, v. 7, n. November 2016, p. 44286, 2017.

PAHO. **PAHO WHO | Regional Zika Epidemiological Update (Americas) December 15, 2016**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regi onal-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691>. Acesso em: 4 nov. 2017.

PANG, I. K.; ICHINOHE, T.; IWASAKI, A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8+ T cell responses to influenza A virus. **Nature Immunology**, v. 14, n. 3, p. 246–253, 13 mar. 2013.

PAUS, S. et al. Axl/Gas6 Pathway-Inducible α Cells Are Regulated by an IFN-Survival and Migration of Human Dendritic. 2009.

PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69–88, 2013.

PERRY, A. K. et al. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. **Cell Research**, v. 15, n. 6, p. 407–422, jun. 2005.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PICHLMAIR, A. et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. **Science (New York, N.Y.)**, v. 314, n. 5801, p. 997–1001, 10 nov. 2006.

PINGEN, M. et al. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1455–1469, 21 jun. 2016.

QUICKE, K. M. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 1, p. 83–90, 2016.

RAMOS, H. J. et al. IL-1β Signaling Promotes CNS-Intrinsic Immune Control of West Nile Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, p. e1003039, 29 nov. 2012.

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

RICHARD, A. S. et al. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, p. 2024–2029, 2017.

ROBY, J. A. et al. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1551–1569, 1 jul. 2015.

ROTHLIN, C. V et al. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune

Response. p. 1124–1136, 2007.

SAMUEL, M. A.; DIAMOND, M. S. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. **Journal of virology**, v. 79, n. 21, p. 13350–61, 1 nov. 2005.

SCHLEE, M. et al. Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus. **Immunity**, v. 31, n. 1, p. 25–34, 17 jul. 2009.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 29 jan. 2016.

SEGAWA, K.; NAGATA, S. An Apoptotic "Eat Me" Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 11, p. 639–650, 1 nov. 2015.

SHRESTA, S. et al. Interferon-Dependent Immunity Is Essential for Resistance to Primary Dengue Virus Infection in Mice, Whereas T- and B-Cell-Dependent Immunity Are Less Critical. **Journal of Virology**, v. 78, n. 6, p. 2701–2710, 15 mar. 2004.

SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **J Immunol**, v. 69, n. 2, p. 223–234, 1952.

SPINDLER, K. R. et al. SJL/J Mice Are Highly Susceptible to Infection by Mouse Adenovirus Type 1. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 75, n. 24, p. 12039–12046, 2001.

STEFANIK, M. et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. **BMC Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2018.

STEWART, K.-A. A. et al. Theiler's virus infection chronically alters seizure susceptibility. **Epilepsia**, v. 51, n. 8, p. 1418–1428, 1 dez. 2009.

SWAMINATHAN, S. et al. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 19, p. 1907–1909, 2016.

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

VENTURA, C. V. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, v. 387, p. 2016, 2015.

WALKER, F. J. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. **The Journal of biological chemistry**, v. 255, n. 12, p. 5521–4, 25 jun. 1980.

WANG, Z. Y. et al. Axl is not an indispensable factor for zika virus infection in mice. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 2061–2068, 2017.

WEBER-STADLBAUER, U. Epigenetic and transgenerational mechanisms in infection-mediated neurodevelopmental disorders. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. e1113, 2017.

WELLS, M. F. et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. **Cell Stem Cell**, v.

19, n. 6, p. 703–708, 2016a.

WU, G. et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20, 31 dez. 2018.

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

YOCKEY, L. J. et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. **Sci. Immunol**, v. 3, n. 5, 2018.

ZAGÓRSKA, A. et al. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. **nature immunology**, v. 15, 2014.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–72, jun. 2015.

ZHANG, C. et al. Elevated Plasma Growth Arrest-Specific 6 Protein Levels Are Associated with the Severity of Disease During Hantaan Virus Infection in Humans. **Viral Immunology**, v. 30, n. 5, p. 330–335, 2017.

ZHANG, F. et al. Excretion of infectious Zika virus in urine. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 641–642, 2016a.

ZHANG, N. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016b.

ZHAO, Z. et al. Viral retinopathy in experimental models of zika infection. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 58, n. 10, p. 4075–4085, 2017.

ANEXOS

A - OLIVEIRA, LG, PERON, JPS. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. *J Leukoc Biol.* 2019; 1- 7. https://doi.org/10.1002/JLB.MR1118-460R.

DOI: 10.1002/JLB.MR1118-460R

REVIEW



Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers

Lilian G. Oliveira¹ Jean Pierre Schatzmann Peron^{2,3}

¹Neuroimmune Interactions Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

²Immunopathology and Alergy PostGraduate Program, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil

³Scientific Platform Pasteur, USP, São Paulo, Brazil

Correspondence

Jean Pierre Schatzmann Peron, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 Lab 232 ICB IV, Cidade Universitária São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil. Email: jeanpierre@usp.br

Abstract

Arboviruses have been a huge threat for human health since the discovery of yellow fever virus in 1901. Arboviruses are arthropod born viruses, mainly transmitted by mosquitoes and ticks. responsible for more than thousands of deaths annually. The Flavivirideae family is probably the most clinically relevant, as it is composed of very important agents, such as dengue, vellow fever, West Nile, Japanese encephalitis, and, recently, Zika virus. Intriguingly, despite their structural and genomic similarities, flaviviruses may cause conditions ranging from mild infections with fever, cutaneous rash, and headache, to very severe cases, such as hemorrhagic fever, encephalitis, Guillain-Barré syndrome, and microcephaly. These differences may greatly rely on viral burden, tissue tropism, and mechanisms of immune evasion that may depend on both viral and host genetic factors. Unfortunately, very little is known about the biology of these factors, and how they orchestrate these differences. In this context, viral structural proteins and host cellular receptors may have a great relevance, as their interaction dictates not only viral tissue tropism, but also a plethora on intracellular mechanisms that may greatly account for either failure or success of infection. A great number of viral receptors have been described so far, although there is still a huge gap in understanding their overall role during infection. Here we discuss some important aspects triggered after the interaction of flaviviruses and host membrane receptors, and how they change the overall outcome of the infection.

KEYWORDS

viral entry receptors, Flavivirus, TAM, TIM, integrins

1 | INTRODUCTION

Arboviruses are viruses transmitted by insects, mostly ticks and mosquitoes, which pose a huge threat to human health, and have caused millions of deaths since the first discovery of yellow fever in 1900.¹ The increasing proximity of human habitation to the forests, the ease of geographic dislocation, and the appearance of very welladapted vectors, such as *Aedes aegypti*, are among the main reasons for such phenomena. Flaviviruses are probably the most important type of arboviruses, with around 70 different viruses causing varied diseases. Dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV), Japanese encephalitis virus (JEV), tick-borne encephalitis (TBE), and Zika virus (ZIKV) are the most important and the most studied members. Interestingly, flavivirus infection may cause conditions ranging from mild headache, fever, and cutaneous rash, to more severe outcomes, such as hemorrhagic fever, encephalitis, liver failure, Guillain-Barré syndrome, and microcephaly.^{2–5} This is clear evidence not only of the epidemiologic and clinical relevance of such pathogens but also of the complexity of their biology in the host organism.

Flaviviruses are enveloped positive-stranded RNA viruses, capable of infecting a wide range of arthropods and mammalian cells either in vitro or in vivo. The relatively simple genome, around 11 Kb long, holds a single open reading frame that codes for structural (capsid

 Received: 24 January 2019
 Revised: 3 April 2019
 Accepted: 10 April 2019

 JLeukoc Biol. 2019;1-7.
 www.ijleukbio.org

Abbreviations: AKT, serine/threonine kinase; APC, antigen presenting cells; C, capsid; DENV, dengue virus; E, envelope; ED, ectodomains; ER, endoplasmic reticulum; ESCRT-0, endosomal sorting complexes required for transport; FAK, focal adhesion kinase; GAS6, growth arrest specific 6; HMEC-1, human microvascular endothelial cells-1; IFNAR, Type I interferon receptor; Ig, immunoglobulin; ISGs, IFN stimulating genes; JAK, janus kinase; JEV, Japanese encephalitis virus; mTOR, mammalian target of rapamycin; NPCs, neuronal precursor cells; NS, non-structural; PDI, protein disulfide isomerase; PE, phosphatidy(Hethnaloanimie; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PrM, premembrane; PROS1, protein S; PS, phosphtidylserine; Rac-1, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; RGD, Arginine, Glycine and Aspartate; SHBG, sex hormone-binding globulin; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAM-1, signal transducing adapter molecule 1; STAT, signal transducer and activator of transcription proteins; TAM, TYRO3, AXL and MERTK; TBE, tick-borne encephalitis; TIM, T-cell immunoglobulin and mucin domain; UTRs, untranslated regions; VACV, vaccinia virus; WNV, west nile virus; YFV, yellow fever virus; ZIKV, zika virus.