

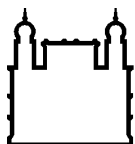
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS NATURAL
KILLER (NK) DURANTE A MONOINFECÇÃO E COINFECÇÃO PELOS VÍRUS
DENGUE E ZIKA

GABRIEL MACEDO COSTA GUIMARÃES

Rio de Janeiro
Abril de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

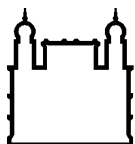
GABRIEL MACEDO COSTA GUIMARÃES

Caracterização fenotípica e funcional de células *Natural Killer* (NK) durante a monoinfecção e coinfecção pelos vírus Dengue e Zika

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadoras: Dra. Elzinandes Leal de Azeredo
Dra. Mariana Gandini

RIO DE JANEIRO
Abril de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: GABRIEL MACEDO COSTA GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) DURANTE A MONOINFECÇÃO E COINFECÇÃO PELOS VÍRUS DENGUE E ZIKA

ORIENTADORAS: Dra. Elzinandes Leal de Azeredo e Dra. Mariana Gandini

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patricia Sequeira	- Presidente- (IOC/FIOCRUZ)
Profa. Dra. Ana Cristina Martins	- (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho	- (FIOCRUZ MINAS)
Profa. Dra. Joanna Reis Santos de Oliveira	- IFRJ
Profa. Dra. Cristiana Couto Garcia	- IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 12 de abril de 2019

Guimarães, Gabriel Macedo Costa.

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) DURANTE A MONOINFECÇÃO E COINFECÇÃO PELOS VÍRUS DENGUE E ZIKA / Gabriel Macedo Costa Guimarães. - Rio de Janeiro, 2019.

130 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Elzinandes Leal de Azeredo.

Co-orientadora: Mariana Gandini.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Dengue. 2. Zika. 3. Células alvo. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família e a todos que tornaram este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) que tornaram possível esta investigação.

Às minhas queridas orientadoras, Elzinandes Azeredo e Mariana Gandini, por todo o apoio e suporte profissional e emocional durante todo o período em que estive envolvido neste projeto.

Aos meus amigos pessoais e profissionais da família LIV pelo enorme prazer de trabalhar ao lado de ótimas pessoas, além de todo o aprendizado.

À plataforma de Citometria de Fluxo por nos auxiliar de modo eficaz sempre que necessário.

À secretaria de ensino do IOC, em especial à Rita, pela paciência, compreensão e eficiência.

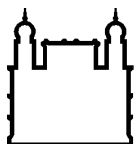
À minha noiva, Taiane Lopes, por toda o carinho e entendimento da minha ausência em diversos finais de semana por estar escrevendo a dissertação.

Aos meus familiares, por todo o apoio, suporte e compreensão. Pessoas como vocês são as quais me espelho. Obrigada por acreditarem na minha capacidade, me apoiarem em todas as minhas decisões e sempre investirem no meu futuro. Amo vocês mais do que tudo.

E a todos que fizeram parte dessa trajetória, e que, de certa forma, foram essenciais para a realização desta caminhada.

“Um cientista no laboratório não é um mero técnico: é uma criança confrontando fenômenos naturais que são tão impressionantes quanto contos de fada”.

Marie Curie



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) DURANTE A MONOINFECÇÃO E COINFECÇÃO PELOS VÍRUS DENGUE E ZIKA

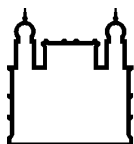
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Gabriel Macedo Costa Guimarães

As arboviroses correspondem uma das principais causas de morbidade e mortalidade humana em áreas tropicais e subtropicais do mundo. O vírus *Dengue* (DENV) é o arbovírus mais importante que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde pública no Brasil. A associação com desordens congênitas e neurológicas, tornou o vírus *Zika* (ZIKV) uma arbovirose de importância médica no Brasil e no mundo. Diversos fatores têm sido associados à patogênese dessas doenças, no entanto, os mecanismos envolvidos não são completamente compreendidos. As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos CD3^{neg} CD56⁺ que fazem parte da resposta imune inata e são fundamentais durante a fase inicial das infecções por meio de suas funções antivirais e citotóxicas contra células-alvo infectadas. Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação das células NK durante a infecção pelo DENV ou ZIKV. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento das células NK durante a infecção e coinfeção pelos vírus DENV e ZIKV. Analisando as células de pacientes naturalmente infectados e coinfectados pelo DENV e ZIKV, observamos maior frequência de células NK em pacientes infectados pelo DENV, em comparação com os demais grupos estudados. Além disso, demonstramos elevada frequência de células NK CD56^{dim} CD16⁺ coexpressando a proteína intracelular perforina e o marcador CD62L em pacientes monoinfectados pelo DENV em comparação com pacientes monoinfectados pelo ZIKV, coinfectados DENV e ZIKV, pacientes com outras doenças febris (ODF) e doadores saudáveis. A quantificação de citocinas demonstrou elevadas concentrações de TNF- α e IL-6 em pacientes infectados pelo DENV e também nos coinfectados. Elevadas concentrações de IFN- γ e de IL-15 foram detectadas nos pacientes com Dengue e nos pacientes coinfectados respectivamente. Também foi padronizado um modelo *in vitro* de cocultura de monócitos humanos infectados pelo DENV-2 ou ZIKV e células NK na presença de IL-2. Os resultados demonstraram um percentual mais baixo de monócitos após a infecção pelo DENV ou ZIKV comparados com a cocultura não infectada. Além disso, também observamos incremento na população de monócitos CD14⁺ CD16⁺ nas coculturas infectadas. Corroborando com nossos dados *ex vivo*, observamos que o subtipo CD56^{dim}

CD16⁺ apresentou elevada coexpressão de perforina e CD62L nas coculturas infectadas. Esses resultados demonstram que as células NK são importantes células efetoras da resposta imune antiviral e estão relacionadas com a imunopatogenese dessas arboviroses de importância médica no Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHENOTYPICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NATURAL KILLER CELLS (NK) DURING THE MONOINFECTION AND COINFECTION BY DENGUE AND ZIKA VIRUSES

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Gabriel Macedo Costa Guimarães

Arboviruses are a major cause of human morbidity and mortality in tropical and subtropical areas of the world. Dengue virus (DENV) is the most important arbovirus that affects public health in Brazil. The association with congenital and neurological disorders, became the Zika virus (ZIKV) an arbovirosis of medical importance in Brazil and in the world. Several characters have been associated with the pathogenesis of diseases, however, the mechanisms are not fully understood. Natural Killer (NK) cells are CD3^{neg} CD56⁺ lymphocytes that are part of the innate immune response and are critical during an early phase of viral infections due to their antiviral and cytotoxic functions against infected target cells. Little is known about the mechanisms of action of NK cells during infection by DENV or ZIKV. Thus, the aim of this study was to evaluate the involvement of NK cells during infection by DENV and ZIKV viruses. Analyzing cells infected with DENV, ZIKV and coinfecting with both, a higher frequency of NK cells was observed in DENV-infected patients compared to the other groups studied. In addition, was detected a high frequency of CD56^{dim} CD16⁺ NK cells by coexpressing an intracellular protein and the CD62L marker in DENV mono-infected patients compared to ZIKV mononuclear cells, coinfecting with DENV and ZIKV, patients with febrile diseases (ODF) and healthy donors. A quantification of cytokines demonstrated the variation of TNF- α and IL-6 in patients infected by DENV and also in those coinfecting. High concentrations of IFN- γ and IL-15 were detected in patients with mono-infected by DENV and coinfecting patients, respectively. An *in vitro* model of coculture of human monocytes infected with DENV or ZIKV and NK cells in the presence of IL-2 was also standardized. The results showed a lower percentage of monocytes after infection by DENV or ZIKV compared to uninfected coculture. In addition, we also observed an increase in the CD14⁺ CD16⁺ monocyte population in the infected cultures. Corroborating with our *ex vivo* data, we also showed that the CD56^{dim} CD16⁺ subtype of NK cells increased the coexpression of perforin and CD62L in infected cocultures. These results demonstrate that NK cells are important effector cells of the antiviral immune response and are related to the immunopathogenesis of these arboviruses of medical importance in Brazil.

ATA

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Os Arbovírus	20
1.1.2 Família Flaviviridae.....	20
1.2 Infecção pelo vírus Dengue	22
1.2.1 <i>Histórico e Epidemiologia</i>	22
1.2.2 <i>Replicação do DENV e células alvo</i>	23
1.2.3 <i>Manifestações clínicas da infecção pelo DENV</i>	25
1.2.4 <i>Imunopatogênese do DEN</i>	26
1.2.4.1 Virulência viral	27
1.2.4.2 Facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE)	28
1.2.4.3 Tempestade de citocinas	28
1.2.4.4 Pecado antigênico original.....	29
1.3 Infecção pelo vírus Zika	29
1.3.1 <i>Histórico e epidemiologia</i>	29
1.3.2 <i>Vírus Zika no Brasil</i>	31
1.3.3 <i>Formas de transmissão do vírus Zika</i>	34
1.3.4 <i>Manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV</i>	35
1.3.5 <i>Patogênese do ZIKV</i>	36
1.3.6 <i>Coinfecções – Dengue e Zika vírus</i>	35
1.4 Coinfecções – Dengue e Zika vírus	38
1.5 Aspectos fenotípicos e funcionais de células <i>Natural Killer</i> (NK)	40
1.5.1 <i>As subpopulações das células NK</i>	40
1.5.2 <i>Mecanismos de inibição ou ativação das células NK</i>	42
1.5.3 <i>Papel das células NK durante a imunopatogênese do DENV e ZIKV</i>	43

2	JUSTIFICATIVA	47
3	OBJETIVOS	49
	3.1 Objetivo Geral.....	49
	3.2 Objetivos Específicos.....	49
4	METODOLOGIA	50
	4.1 População de Estudo.....	50
	4.2 Diagnóstico Laboratorial.....	52
	4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	53
	4.4 Fenotipagem de células dos pacientes por citometria de fluxo.....	54
	4.5 Obtenção de partículas virais.....	55
	4.6 Purificação de partículas virais.....	55
	4.7 Isolamento de células NK humanas	56
	4.8 Isolamento de monócitos humanos pelos vírus Dengue ou Zika.....	57
	4.9 Infecção de monócitos humanos	58
	4.10 Cocultura de células NK com monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV.....	58
	4.11 Imunofetipagem de superfície e Intracelular por citometria de fluxo.....	59
	4.12 Quantificação de citocinas séricas por ELISA.....	61
	4.13 Extração de RNA Viral.....	61
	4.14 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase.....	62
	4.15 Análise estatística	63
5	RESULTADOS	64
	5.1 Caracterização fenotípica de subpopulaçõesde células NK no sangue periférico de pacioentes mono e coinfectados pelo	

DENV e ZIKV	64
5.1.1 <i>Análise da frequência das subpopulações de células NK circulantes em pacientes monoinfectados pelo DENV ou ZIKV e coinfectados pelo DENV e ZIKV</i>	66
5.1.2 <i>Perfil de ativação das subpopulações de células NK circulantes em pacientes monoinfectados pelo DENV ou ZIKV e coinfectados pelo DENV e ZIKV</i>	64
5.1.3 <i>Dosagem das citosinas circulantes em pacientes</i>	71
5.2 Padronização funcional de células NK em modelo de cocultura de células NK com monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV	74
5.2.1 <i>Padronização da cocultura de células NK e monócitos</i>	74
5.2.2 <i>Análise de frequência de células NK e monócitos em cocultura</i>	77
5.2.3 <i>Perfil de ativação das subpopulações de células NK em cocultura com monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV ultracentrifugados</i>	79
5.2.4 <i>Avaliação da frequência de monócitos CD14⁺ CD16^{neg} e CD14⁺ CD16⁺ em cocultura após estímulo pelo DENV ou ZIKV ultracentrifugados</i>	81
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: <i>Genoma dos Flavivirus</i>	21
Figura 1.2: Casos suspeitos de Dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil entre 2016 e 2018	23
Figura 1.2.1: Classificação dos casos de Dengue de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009)	26
Figura 1.3.1: Distribuição da incidência de Zika e casos notificados e confirmados de microcefalia no Brasil durante 2016.....	32
Figura 1.3.2: Casos suspeitos de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil entre 2016 e 2018.....	33
Figura 1.4.1: Representação esquemática das funções fisiológicas das células NK.....	43
Figura 4.1: Fluxograma do desenho experimental para estudo do perfil Fenotípico e funcional das células NK na resposta imune anti DENV e anti ZIKV <i>in vivo</i> e em cocultura de células NK e monócitos infectados <i>in vitro</i>	53
Figura 5.1: Frequência das subpopulações de células NK em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados.....	65
Figura 5.2: Frequência de células NK perforina positivas em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados	67
Figura 5.3: Frequência de células NK CD62L positivas em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados.....	68

Figura 5.4: Perfil de ativação das subpopulações de células NK Perforina ⁺ e CD62L ⁺ em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados.....	70
Figura 5.5: Citocinas circulantes em pacientes infectados pelo DENV ou ZIKV e coinfectados com DENV e ZIKV.....	72
Figura 5.6: Purificação das células <i>Natural Killer</i>	74
Figura 5.7: Padronização da concentração de IL-2 para ativação de células <i>Natural Killer</i>	76
Figura 5.8: Purificação de monócitos.....	77
Figura 5.9: Porcentagem de monócitos e células <i>Natural Killer</i> em cocultura após estimulação pelo DENV-2 ou ZIKV ultracentrifugados.....	78
Figura 5.10: Dados preliminares da ativação das células <i>Natural Killer</i> CD62L e perforina positivas durante estimulação pelo DENV-2 ou ZIKV <i>in vitro</i>	80
Figura 5.11: Microscopia de campo claro de monócitos.....	82
Figura 12: Frequência de monócitos CD14 ⁺ CD16 ^{neg} e CD14 ⁺ CD16 ⁺ em cocultura após estímulo com DENV ou ZIKV <i>in vitro</i>	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Dados demográficos, laboratoriais e clínicos dos pacientes infectados pelo DENV e/ou ZIKV.....	51
Tabela 4.2 Combinação de anticorpos monoclonais para marcação de superfície e intracelular por citometria de fluxo.....	60
Tabela 4.3 Kits comerciais de ELISA para quantificação das citocinas.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue sorotipo 4
ELISA	Ensaio imuno-enzimático (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FD	Febre do Dengue
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina -12
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
NK	Células matadoras naturais (do inglês <i>Natural Killer cells</i>)
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Tampão salina fosfato
PrM	Precursor da proteína M
Proteína C	Proteína do Capsídeo
Proteína E	Proteína do Envelope
Proteína M	Proteína de Membrana
ORF	Fase aberta de leitura (do inglês <i>Open Reading Frame</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
SE	Semana Epidemiológica
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika
WNV	Vírus do Oeste do Nilo (do inglês <i>West Nile Virus</i>)
JEV	Vírus da encefalite japonesa (do inglês <i>Japanese encephalitis virus</i>)

FHD	Febre hemorrágica do dengue
SCD	Síndrome do choque do dengue
DG	Dengue grave
DENCO	Controle da dengue (do inglês <i>Dengue Control</i>)
DC-SIGN	Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de célula dendrítica (do inglês <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>)
SGB	Síndrome Guillain-Barré
TLR	receptores do tipo toll (do inglês <i>Toll-like receptors</i>)
CD	Grupamento de diferenciação (do inglês <i>cluster of differentiation</i>)
IL	Interleucina
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
APC	Células apresentadoras de antígeno (do inglês <i>antigen-presenting cell</i>)
CLP	Progenitor comum linfoide (do inglês <i>common lymphoid progenitor</i>)
KIR	Receptores semelhantes a imunoglobulina de células “Killer” (do inglês <i>Killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Arbovírus

O termo arbovírus é um acrônimo da expressão em inglês *arthropod-borne vírus*, que engloba todos os vírus que são transmitidos por vetores artrópodes. São transmitidos aos seres humanos principalmente por meio da picada de mosquitos e carrapatos infectados (DOUGHTY *et al.*, 2017; SUKHRALIA *et al.*, 2019).

Durante as últimas décadas, o aumento da emergência e reemergência de arboviroses indicou que patógenos transmitidos por vetores artrópodes continuam sendo uma ameaça para a saúde pública. Infecções como dengue, zika, chikungunya e febre amarela estão ocorrendo em nível global e não se limitam a qualquer região em desenvolvimento ou tropical no mundo (LIANG; GAO; GOULD, 2015). O vírus Dengue (DENV) está em ascensão, causando aproximadamente 390 milhões de infecções em seres humanos por ano. Nos últimos três anos, o vírus Zika (ZIKV) se espalhou por todo o mundo. O vírus Chikungunya (CHIKV) se espalhou pelo globo no início do século XXI, enquanto o vírus da febre amarela (YFV) ressurgiu na África e nas Américas (WILDER *et al.*, 2017; MAYER *et al.*, 2017).

A expansão dessas arboviroses pode ser explicada a partir da intensificação de condições que favoreceram a proliferação e dispersão de mosquitos do gênero *Aedes*, como resultado da urbanização não planejada, implementação ineficiente de programas de controle de vetores. Além disso, o abastecimento irregular de água associado às práticas de armazenamento de água, e a falta de envolvimento da comunidade, além da vontade política fazem parte do conjunto de fatores responsáveis pelo aumento das arboviroses nos últimos anos (HORSTICK, *et al.* 2010; GUBLER, 2011; KILPATRICK, 2012; GOULD *et al.*, 2017; LINDSAY, 2017; ROIZ *et al.*, 2018).

Os arbovírus são membros de cinco famílias distintas: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (DOUGHTY *et al.*, 2017). A família *Flaviviridae* é composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O vírus da febre amarela (YFV, *Yellow Fever Virus*), vírus do Oeste do Nilo (WNV, *West Nile virus*), vírus da Encefalite Japonesa (JEV,

Japanese encephalitis virus), vírus Dengue (*DENV*, *Dengue virus*) e vírus Zika (*ZIKV*, *Zika virus*) representam membros de importância médica do gênero *Flavivirus*, responsáveis por altos índices de mortalidade e morbidade ao redor do mundo (GUBLER, 2002; KILPATRICK, *et al*, 2012).

1.1.2 Família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* compartilha diversas características em comum, são: vírus esféricos com simetria icosaédrica, tamanho entre 40-65nm e genoma composto de fita simples de RNA (Ácido Ribonucleico) com polaridade positiva com cerca de dez a onze mil pares de bases, contendo uma única sequência de leitura aberta (ORF, open Reading frame) codificando uma poliproteína posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M, E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (OLIVEIRA, 2016; GARCIA-BLANCO, 2016) (Figura 1.1).

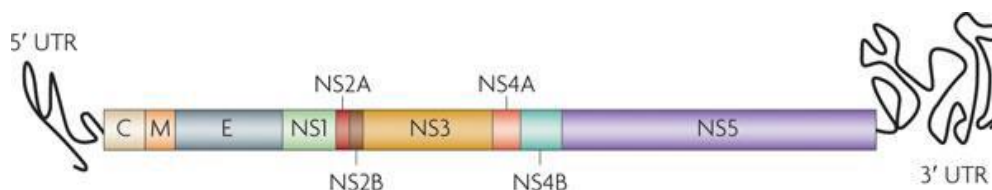


Figura 1.1: Genoma dos *Flavivirus*. Imagem representativa do genoma de um flavivírus, destaca-se a região que codifica as proteínas estruturais, como a do capsídeo (C), membrana (M – transcrita na sua forma precursora pre-M) e a do envelope (E); além da região que codifica as proteínas não-estruturais, como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. **Fonte:** Adaptado de GUZMAN *et al.*, 2010

Após a ingestão de sangue de hospedeiro infectado, os vírus se multiplicam dentro dos tecidos do artrópode, consistindo o período de incubação extrínseco, gerando altos títulos virais, particularmente nas glândulas salivares. Os vírus são então passados para seres humanos ou outros vertebrados durante a picada de insetos (LAURETI, *et al*, 2018).

A maioria das doenças causadas por arbovírus são zoonoses, ou seja, são principalmente infecções de vertebrados não humanos, que ocasionalmente podem causar infecções acidentais em humanos. Sendo o DENV uma exceção, já que os seres humanos são os hospedeiros primários entre os vertebrados (HANLEY & WEAVER, 2008).

1.2 Infecção pelo vírus Dengue

1.2.1 Histórico e Epidemiologia

A dengue se tornou a arbovirose mais difundida no mundo e está presente em todos os continentes, atingindo mais de 100 países. As áreas tropicais e subtropicais são as mais atingidas pelo fato de estarem densamente povoadas pelo mosquito transmissor *Aedes aegypti*, que é responsável pela manutenção do ciclo de transmissão do vírus (GUBLER, 1998).

O agente etiológico da dengue é o DENV, transmitido por mosquitos fêmeas, principalmente da espécie *Aedes aegypti* e, em menor grau, *Aedes albopictus* em um ciclo humano-mosquito-humano. O DENV possui quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4) que compartilham 65%-75% de homologia entre suas sequências de RNA, são classificados de acordo com critérios imunológicos e biológicos, e todos os sorotipos são capazes de causar o amplo espectro de quadros clínicos da dengue (CALISHER, 1989) GUBLER, 1997). Infecções por qualquer um dos quatro sorotipos confere imunidade de longa duração para o sorotipo homólogo. Observa-se uma imunidade cruzada entre sorotipos logo após a infecção primária, porém, após 6 meses o hospedeiro torna-se suscetível a infecção pelos outros sorotipos do DENV (BHATT *et al.*, 2013).

Estima-se que a incidência anual global é de cerca de 400 milhões de casos suspeitos, resultando em aproximadamente 500.000 hospitalizações por ano (LIM, 2018). Outro estudo, coletou diversos dados da incidência mundial de dengue em 2013 em 141 países e territórios com transmissão ativa de dengue, e estimou um total de 58-40 milhões de casos de infecção pelo DENV, incluindo um total de 13.586 casos fatais e um custo total aproximado de 9 bilhões de dólares (SHEPARD *et al.*, 2016). Há diversos fatores que influenciam essa pandemia, incluindo a globalização, a dispersão do vetor mosquito *Aedes*, inadequação de urbanização e a ausência de uma vacina licenciada ou terapêutica anti-dengue (SIMMONS *et al.*, 2012).

Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, foram registrados 239.389 casos prováveis de dengue no Brasil em 2017. Em 2018, foram registrados 203.157 casos, com uma

incidência de 97,8 casos/100 mil habitantes (Figura 1.2.1). A região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis em relação ao total do país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, SE 36, 2018).

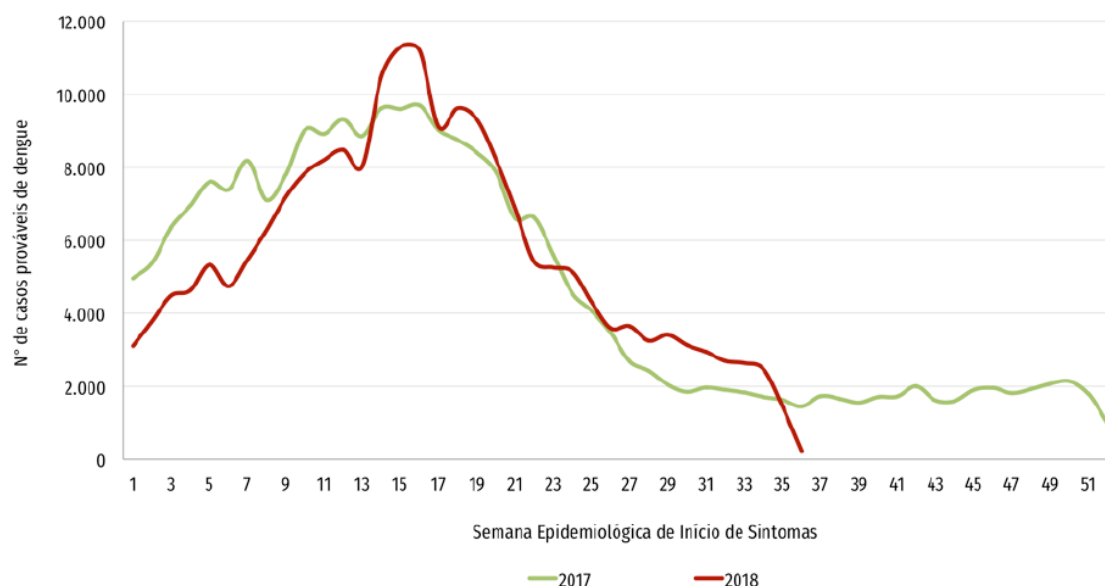


Figura 1.2: Casos suspeitos de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil entre 2016 e 2018. Fonte: Sinan NET (banco de 2016 atualizado em 23/06/2017; de 2017 em 23/01/2018; e de 2018, em 30/05/2018).

1.2.2 Replicação do DENV e células alvo

A infecção pelo DENV inicia-se com a picada do mosquito e liberação dos vírus juntamente com a secreção salivar do vetor. A partícula viral interage com a membrana plasmática da célula alvo e é internalizada (MUKHOPDHYAY *et al.*, 2005).

De modo inicial a estabelecer a infecção, o DENV liga-se primeiramente aos receptores da célula hospedeira através da proteína E na membrana celular. A interação ligante-receptor inicia a captação do virion por meio da endocitose mediada pelo receptor (ACOSTA *et al.*, 2014.; VAN DER SCHAAR *et al.*, 2008).

Dentro do endossomo ácido tardio, a fusão da membrana ocorre quando o envelope do virion se funde com a membrana endossomal, seguido da liberação do nucleocapsídeo e liberação do RNA viral no citoplasma (MODIS *et al.*, 2004). O genoma de RNA do DENV é traduzido em uma única poliproteína

pelos ribossomos do hospedeiro e a poliproteína é então clivada por proteases virais e do hospedeiro, para liberar proteínas virais individuais (ACOSTA *et al.*, 2014).

Os principais alvos para a replicação do DENV são os fagócitos mononucleares, tais como os macrófagos, monócitos e as células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*) (WANG *et al.*, 2002; KOU *et al.*, 2007; DURBIN *et al.*, 2008). Foram detectados antígenos virais em células de baço, pulmão, fígado, células endoteliais e células de Kupffer de casos fatais (JESSIE *et al.*, 2004; PÓVOA *et al.*, 2014).

Em modelos *in vitro*, DENV é capaz de infectar diversas linhagens celulares, tais como: células VERO (células renais de macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*), a linhagem C6/36 proveniente do clone do mosquito *Ae. albopictus*, HepG2 e Huh7 (linhagem de hepatócitos) (THEPPARIT *et al.*, 2013) EA.hy926 (células endoteliais humanas) (KANLAYA *et al.*, 2009) HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) e HUASMC (células musculares lisas da artéria umbilical humana) (ARIAS-ARIAS *et al.*, 2018) HMVEC (Células endoteliais da microvasculatura) (KELLEY *et al.*, 2012) e HMEC-1 (células endoteliais da microvasculatura dermal humana) (TALAVERA *et al.*, 2004). Além disso, monócitos humanos e DCs são suscetíveis à infecção e são utilizados como modelo de estudo de infecção pelo DENV (GANDINI *et al.*, 2013; LIBRATY *et al.*, 2001; GANDINI *et al.*, 2011).

Apesar dos esforços para determinar as moléculas responsáveis para reconhecimento de DENV pelas células alvo, receptores específicos para DENV ainda não foram definitivamente identificados (HIDARI & SUZUKI, 2011). No entanto, há alguns candidatos, como por exemplo: o receptor de manose, receptor CD14, glicosaminoglicanos como o heparam sulfato (presente em monócitos e macrófagos), e a molécula de adesão das células dendríticas (DC-SIGN, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015).

1.2.3 Manifestações clínicas da infecção pelo DENV

A infecção pelo vírus Dengue apresenta um amplo espectro clínico. Até 75% das infecções por DENV são assintomáticas independentemente da faixa etária (FREEMAN, 2018). Os casos sintomáticos apresentam inicialmente sintomas brandos como uma febre indiferenciada que pode ser caracterizada como febre do dengue (FD). Muitas vezes, a FD não é diagnosticada devido à dificuldade no diagnóstico clínico, uma vez que é confundida com outras doenças virais (HASAN *et al.*, 2016).

Antes da classificação da OMS de 2009, dengue era classificada em febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) de acordo com a classificação da OMS de 1997. Esse sistema de classificação mostrou diversas limitações, especialmente no diagnóstico de pacientes graves que não se incluíam nos rigorosos critérios de FHD (VIEIRA MACHADO *et al.*, 2014).

A dificuldade em seguir os parâmetros clássicos da OMS de 1997 (WHO, 1997) na triagem dos casos graves da dengue, evidenciou e incentivou a necessidade de um estudo amplo para estabelecer um esquema de classificações que possa ser utilizado por toda a América Latina (YACOUB *et al.*, 2013). A nova classificação da OMS de 2009 classificou os pacientes em 3 grupos distintos: dengue sem sinais de alarme (FD), dengue com sinais de alarme (FDSA) e dengue grave (DG) (OMS, 2009).

Em linhas gerais, a dengue é uma doença de baixa mortalidade, em que podem ocorrer infecções sequenciais por diferentes sorotipos, e acometer crianças e adultos. Os sintomas que caracterizam a doença são: dor de cabeça, artralgia, mialgia, o aparecimento súbito de febre alta, dor retro-orbital e desconforto abdominal. Em alguns casos, podem ser detectados eritemas máculo-papular. A febre geralmente é bifásica, podendo durar de 2 a 7 dias. As manifestações hemorrágicas podem ocorrer em alguns indivíduos com FD. Trombocitopenia é comum em dados laboratoriais associados à FD, sendo que 34% dos pacientes com FD possuem contagem de plaquetas menor do que 100.000 mm³. A principal característica dos casos graves é o extravasamento do plasma como consequência do aumento da permeabilidade vascular, o que pode

ser diagnosticado por meio da observação de aumento no hematócrito (OMS, 2009).

Um novo estudo de avaliação dos sinais e sintomas associados com a gravidade, apoiado pela OMS intitulado *Dengue Control* (DENCO), apresentou uma nova classificação clínica em uso pela OMS desde 2009 (Figura 1.1), que leva em conta os níveis de gravidade para o atendimento clínico (OMS, 2009).

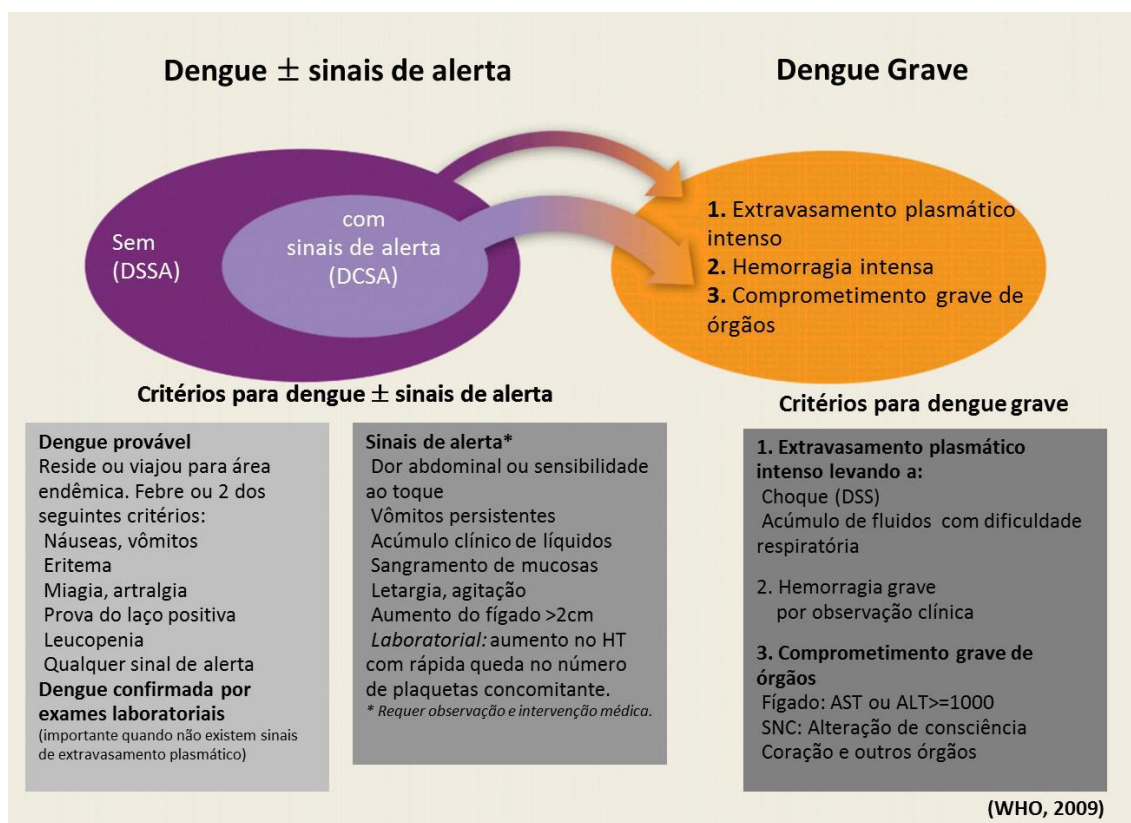


Figura 1.2.1: Classificação dos casos de dengue de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009).

1.2.4 Imunopatogênese do DENV

A infecção por qualquer um dos sorotipos virais resulta em uma imunidade de longa duração para o sorotipo homólogo, no entanto, a divergência entre suas sequências não possibilita uma proteção contra sorotipos heterólogos (ROTHMAN, 2011). Estudos sugerem que em uma infecção secundária por um sorotipo diferente seria um risco para a forma grave da doença (SANGKAWIBHA *et al.*, 1984; GUZMAN *et al.*, 1990). Assim, a patogênese da dengue não está

relacionada apenas com o vírus, como também a uma interação de fatores ambientais e do hospedeiro.

Diversos mecanismos têm surgido para explicar esses fenômenos relacionados às infecções secundárias e aos diferentes sorotipos de DENV, entre os quais, destacam-se a teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE) e a teoria do pecado antigênico original (MONGKOLSAPAYA *et al*, 2003). Além da infecção secundária heterotípica (quando o sorotipo viral é diferente do da infecção primária) que é o maior fator de risco, outros fatores influenciam na gravidade da doença como os genótipos e sorotipos virais, a idade, o intervalo entre as infecções e os fatores específicos do hospedeiro (WANG *et al.*, 2017; KATZELNICK, 2017). No entanto, o completo entendimento da imunopatogênese da dengue ainda é um desafio.

A seguir, serão discutidos os principais mecanismos envolvidos com a imunopatogênese do DENV.

1.2.4.1 Virulência viral

De acordo com esse conceito, sugere-se que determinadas cepas virais estariam relacionadas às formas graves da dengue, visto que as formas mais graves podem ocorrer também em infecções primárias (MATHEW, 2008; LEITMEYER *et al.*, 1999) e que elevada carga viral foi correlacionada com casos graves de dengue (DUYEN *et al*, 2011).

Estudos epidemiológicos vêm constatando que determinados genótipos têm sido relacionados à maior incidência de formas graves de dengue, como no caso da cepa DENV-2 do Sudeste Asiático que foi associada com casos graves quando comparada à cepa DENV-2 Americana (WATTS *et al.*, 1999).

O sequenciamento genético de cepas circulantes revelou que o genótipo americano raramente está associado à FHD/SCD (LEITMEYER *et al.*, 1999), enquanto as cepas asiáticas estão relacionadas às formas mais graves da dengue (WATTS *et al.*, 1999).

No Brasil, a introdução de uma nova linhagem asiática de DENV-2 foi relacionada ao aumento no número de casos graves e fatais. Esse aumento pode ser explicado pela introdução de cepas do genótipo asiático no continente,

que teriam maior vantagem seletiva em relação às cepas americanas (LIU *et al.*, 2011; FARIA *et al.*, 2013; WAN *et al.*, 2013; NUNES, *et al.*, 2016).

Além do genótipo, estudos recentes demonstraram a relação entre sorotipos e a gravidade da dengue, sugerindo que DENV-1 e DENV-4 estariam ligados a um maior número de casos brandos, enquanto DENV-2 e DENV-3 promoveriam mais casos graves (FRIED *et al.*, 2010; HERING, 2017).

1.2.4.2 Facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE)

Este mecanismo sugere que embora protetora, a resposta humoral também poderia impactar na gravidade da doença. Dados epidemiológicos apontam como fatores de risco: a infecção sequencial por dengue ou a infecção primária em crianças nascidas de mães imunes à flavivírus (HALSTEAD, 1988; KLIKS *et al.*, 1988).

A resposta imunológica contra o sorotipo infectante do DENV promove imunidade duradoura a este sorotipo, e também, por até seis meses, aos outros sorotipos. Neste sentido, Hastead e O'rourke propuseram a teoria da ADE. Os pesquisadores demonstraram que células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de primatas não humanos infectadas pelo DENV *in vitro*, apresentaram aumento da infecção após a adição de anticorpos específicos contra DENV. (HALSTEAD & O'ROURKE, 1997). Acredita-se que esse aumento contribua para o agravamento da doença.

1.2.4.3 Tempestade de citocinas

Este conceito refere-se à liberação exacerbada ou descontrolada de citocinas pró-inflamatórias – “tempestade de citocinas” - e tem sido associada ao aumento da permeabilidade vascular, manifestações hemorrágicas, podendo levar ao desenvolvimento do choque hipovolêmico, resultando em morte (BASU & CHATURVEDI, 2008; ROTHMAN, 2011; COSTA *et al.*, 2013). Na infecção pelo DENV, o extravasamento plasmático é uma das principais consequências postuladas devido a tempestade de citocinas (TISONCIK *et al.* 2012).

Citocinas como IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-7, GM-CSF e MIF, além de outras, têm sido observadas em níveis elevados em pacientes graves quando comparados com pacientes brandos (GREEN *et al*, 1999a; CHEN *et al.*, 2005; BOZZA *et al*, 2008).

1.2.4.4 Pecado antigênico original

Este mecanismo foi proposto por Mongkolsapaya e colaboradores em 2003, em que sugere que a gravidade da doença observada durante infecções secundárias ocorreria devido à participação de células T de memória de reatividade cruzada (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003).

Desta forma, de acordo com esta teoria, durante uma infecção primária, ocorre expansão de clones de células T específicas para o sorotipo infectante e geração de células T de memórias. Já no caso de uma segunda infecção por um outro sorotipo, as células T de memória geradas na primeira infecção, reagiriam de forma cruzada contra o vírus da infecção secundária. Porém, essa expansão de células T com baixa avides para o sorotipo infectante e alta avides para o sorotipo de uma infecção anterior, produz uma enorme quantidade de mediadores inflamatórios, favorecendo o aumento da permeabilidade vascular, podendo levar ao quadro de hemorragias graves, choque hipovolêmico e a morte (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003).

1.3 Infecção pelo vírus Zika

1.3.1 Histórico e epidemiologia

Entre os anos de 1914 a 1970, diversos vírus foram isolados por um grupo de pesquisadores britânicos e americanos em um programa de pesquisa sobre a ocorrência natural de febre amarela (YFV – Yellow fever vírus) em Uganda, patrocinado pela Fundação Rockefeller. Dentre esses vírus encontrados, estava o Zika vírus (DICK *et al.*, 1952).

Aproximadamente a 11 quilômetros à nordeste do instituto de pesquisa, tinha uma área florestal chamada Zika. Esta área de floresta consiste em um cinturão estreito e denso de grandes árvores. Encontra-se ao longo da borda do Lago Vitória, em Uganda. Devido à incidência relativamente alta de imunidade à febre amarela entre os macacos na península de Entebbe, a floresta Zika foi escolhida como uma das áreas de estudo da febre amarela (DICK *et al.* 1952; DICK, 1953).

Em abril de 1947, seis gaiolas sentinelas contendo macacos rhesus (*Macaca mulata*) foram posicionadas na copa de árvores da floresta Zika, área onde estes macacos serviriam como potencial hospedeiro para a população local de mosquitos, conhecida por transmitir YFV. A temperatura dos macacos rhesus eram medidas diariamente nas gaiolas. No dia 18 de abril de 1947, foi registrado um aumento na temperatura de um dos macacos – Rhesus 766 – de 39.7°C.

No dia seguinte, a temperatura tinha chegado a 40°C. No terceiro dia de febre, uma amostra de sangue foi coletada do Rhesus 766. O soro foi injetado via intracerebral e intraperitoneal em um grupo de camundongos *Swiss*. Nos camundongos que foram inoculados intraperitonealmente, não houve nenhuma anormalidade durante o período de observação de trinta dias. No entanto, o grupo em que foi inoculado soro intracerebralmente mostrou sinais de enfermidade no décimo dia após a inoculação. O agente filtrável foi isolado do cérebro desses camundongos infectados, e foi assim, o primeiro isolamento do vírus Zika (DICK *et al.*, 1952; DICK, 1953).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o isolamento de ZIKV em seres humanos foi obtido no ano de 1954, quando foi isolado do soro de uma menina nigeriana de dez anos de idade (MACNAMARA, 1954). Entretanto, dados recentes sugerem que o primeiro isolamento viral de ZIKV em humanos ocorreu em Uganda, por Simpson em 1964. Uma década após o primeiro relato errôneo por Macnamara, em que o isolamento viral publicado em 1954 foi, na verdade, de um vírus similar ao ZIKV, denominado Spondeweni vírus (WIKAN & SMITH, 2017).

Um estudo na década de 70 demonstrou que 40% da população da Nigéria possuía anticorpos neutralizantes contra ZIKV, demonstrando assim, a elevada prevalência de infecção no país (FAGBAMI, 1979). Já fora do continente

africano, o vírus foi detectado pela primeira vez em humanos nos anos entre 1977-1978, na população local da Indonésia (OLSON *et al.*, 1981).

Não foram localizadas publicações com relatos de casos de zika no período de 1983-2006. O surgimento do surto de ZIKV em 2007 na ilha Yap na Micronésia, foi o primeiro relato de infecção pelo vírus fora do continente africano e asiático (DUFFY *et al.*, 2009).

1.3.2 Vírus Zika no Brasil

Os primeiros relatos de pacientes com quadro de doença exantemática associado à conjuntivite e artralgia começaram a surgir no final de 2014 no Brasil (CARDOSO *et al.*, 2015), se tornando o primeiro país do continente americano afetado pela doença. Em fevereiro de 2015, o Ministério da Saúde confirmou o surto de doença exantemática no Brasil.

Em Abril do mesmo ano, foi confirmada a circulação do vírus no Nordeste do Brasil, quando pesquisadores da Universidade Federal da Bahia detectaram o genoma do ZIKV em 7 de 24 amostras sorológicas de fase aguda de pacientes exantemáticos de Camaçari, Bahia, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (CAMPOS *et al.*, 2015).

A transmissão autóctone no Brasil foi confirmada por Zanluca e colaboradores do Instituto Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz no Paraná, em amostras oriundas do Rio Grande do Norte. Foram encontradas 8 amostras positivas, sendo que a análise filogenética demonstrou alta similaridade com sequências da linhagem asiática do vírus Zika (ZANLUCA *et al.* 2015).

Acredita-se que até o final de 2015, os casos suspeitos de ZIKV variaram entre 440.000 a 1.300.000 (HENNESSEY *et al.*, 2016). Já em novembro de 2016, casos autóctones da doença foram confirmados em todos os 26 estados do Brasil, com aproximadamente 211.770 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, tendo sido confirmados 126.395 casos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 49, 2016).

Além dos casos convencionais de ZIKV no Brasil, a infecção pelo vírus foi associada com a microcefalia e Síndrome Guillain-Barré (SGB), sendo a SGB inicialmente proposta durante o surto na Polinésia Francesa. (CALVET *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016; CAO-LORMEAU *et al.*, 2016) (Figura 3).

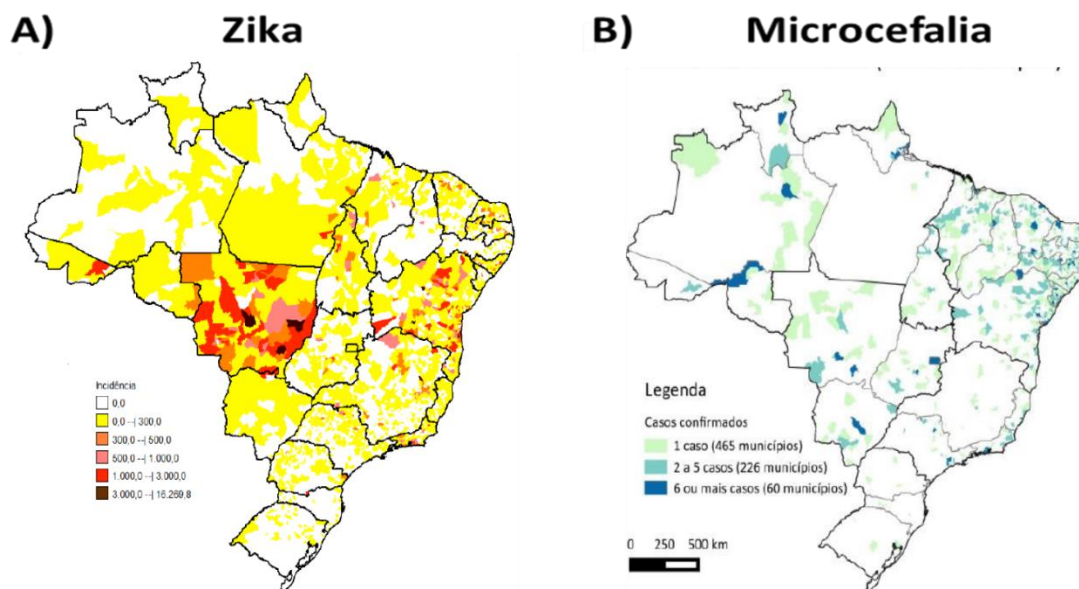


Figura 1.3.1: Distribuição da incidência de Zika e casos notificados e confirmados de microcefalia no Brasil durante 2016. (A) Incidência (/100 mil habitantes.) de febre pelo vírus Zika por município, até a Semana Epidemiológica 49 no Brasil em 2016. **(B)** Casos confirmados de microcefalia ou alteração do sistema nervoso central até a Semana Epidemiológica 52 no Brasil em 2016. Adaptado de boletins epidemiológicos para: Zika (<http://tinyurl.com/jno38tt>) e microcefalia (<http://tinyurl.com/hm2ag4g>) [acessados em 12 de Dezembro de 2018].

Em 2017, foram confirmados laboratorialmente 8 óbitos por ZIKV, sendo quatro no estado do Rio de Janeiro, dois em Espírito Santo, um no Maranhão e um na Paraíba. Foram registrados 216.207 casos prováveis de febre ZIKV em recém-nascidos, natimortos ou abortamento. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de Zika, segundo regiões geográficas, demonstrou que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentaram as maiores taxas de incidência: 38,8 casos/100 mil habitantes e 12,5 casos/100 mil habitantes, respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 50, 2017).

Segundo o monitoramento dos casos de doença aguda pelo ZIKV até a Semana Epidemiológica 42 de 2018, foram registrados 7.544 casos suspeitos de doença pelo ZIKV no país, com taxa de incidência de 3,6 casos/100 mil

habitantes. A região Sudeste apresentou o maior número de casos suspeitos (2.779 casos; 36,8%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Nordeste (2.184; 29,0%), Centro-Oeste (1596 casos; 21,2%), Norte (944 casos; 12,5%) e Sul (41 casos; 0,5%). Já a análise da taxa de incidência de casos prováveis de Zika, segundo regiões geográficas, demonstra que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 10,1 casos/100 mil habitantes e 5,3 casos/100 mil habitantes, respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, SE 30, 2018).

A Figura 1.3.2 mostra os casos suspeitos de ZIKV no Brasil, por semana epidemiológica de início dos sintomas, entre os anos de 2016 até 2018. Nesse gráfico é possível observar que em 2016 ocorreu a epidemia de ZIKV afetando milhares de pessoas, enquanto nos anos de 2017 e 2018 diminuiu drasticamente o número de casos suspeitos à infecção pelo ZIKV no Brasil.

A análise dos casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica no Brasil entre os anos de 2016 até 2018, permite verificar a redução drástica no número de casos desde 2016, conforme o gráfico abaixo.

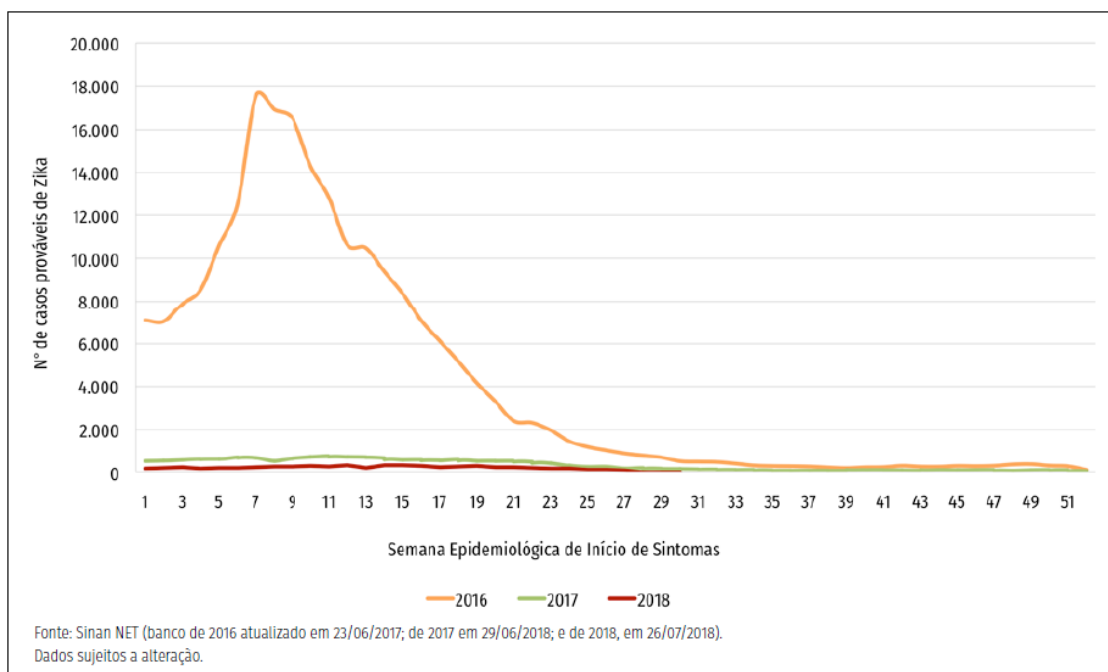


Figura 1.3.2 – Casos suspeitos de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil entre 2016 e 2018. Fonte: Sinan NET (banco de 2016 atualizado em 23/06/2017; de 2017 em 23/01/2018; e de 2018, em 30/05/2018).

Em relação à introdução e rota de dispersão do ZIKV, inicialmente acreditava-se que o vírus fora introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo, a qual aconteceu durante os meses de junho e julho de 2014. No entanto, nenhum país endêmico para a arbovirose participou da competição (MUSSO, 2015). Isto não exclui totalmente a possibilidade de introdução do vírus na época da Copa, já que torcedores procedentes de países endêmicos para ZIKV possam ter vindo ao Brasil e assim, introduzido o vírus.

Posteriormente, um estudo sugeriu que o ZIKV possa ter entrado no país durante o campeonato internacional de canoagem que aconteceu em agosto de 2014 no Rio de Janeiro e possuía participantes de quatro áreas endêmicas: Nova Caledônia, Polinésia Francesa, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (MUSSO, 2015). Outras hipóteses sugerem que a introdução do ZIKV seja proveniente da visita do Papa Francisco, com a chegada de muitos jovens católicos da África e Ásia no Brasil durante a Jornada Mundial da Juventude em julho de 2013 (EPELBOIN *et al.* 2017). Já que as manifestações clínicas do ZIKV se confundem com aquelas causadas por outras arboviroses endêmicas no Brasil, como a dengue, a introdução do ZIKV provavelmente foi despercebida.

1.3.3 Formas de transmissão do vírus Zika

O ciclo natural de transmissão de ZIKV envolve majoritariamente a picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (LI *et al.*, 2012; DIAGNE *et al.*, 2015), e considera-se que o *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus Zika por sua abundância urbana e natureza antropofílica (HAYES 2009, KRAEMER *et al.*, 2015).

A espécie *Ae.albopictus* é considerada um vetor secundário, capaz de transmitir outros flavivírus incluindo DENV e CHIKV, assim como o *Ae.aegypti*. (GRARD *et al.*, 2014). No entanto, mosquitos *Ae.albopictus* preferem áreas com vegetação, servindo como ponte entre a floresta e as áreas urbanas (PAUPY *et al.*, 2009).

Diferentemente dos demais arbovírus, como DENV, CHIKV e YFV, o vírus Zika possui além da transmissão vetorial, outros modos de transmissão que representam a importação de ZIKV em regiões fora do território onde circulam

os vetores ou em áreas que ainda não haviam experimentado surtos (GREGORY *et al.*, 2017). Outras formas de transmissão não-vetoriais já foram estudadas, entre elas: transmissão sexual, transplacentária e através de transfusão de sangue (BESNARD *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2015; ADIBI *et al.*, 2016; SUBISSI *et al.*, 2018).

O vírus Zika já foi detectado no sangue (BEARCROFT 1956., MUSSO *et al.*, 2014) saliva humana (MUSSO *et al.*, 2015), sêmen (ATKINSON *et al.*, 2016), leite materno (BLOHM *et al.*, 2018) urina (GURINAT *et al.*, 2015) e no trato genital feminino (PRISANT *et al.*, 2016). Recentemente, Musso e colaboradores encontraram achados laboratoriais que propiciaram maior suporte para a comprovação da transmissão sexual (MUSSO *et al.*, 2015). Outros estudos confirmaram a detecção de RNA viral no sêmen de diversos homens que apresentaram sintomas de infecção por ZIKV (FOY *et al.*, 2011; MUSSO *et al.*, 2015; ATKINSON *et al.*, 2016). Além disso, a carga viral no sêmen foi maior do que em comparação com a urina ou sangue (ATKINSON *et al.*, 2016; MANSUY *et al.*, 2016).

1.3.4 Manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV

Assim como DENV, a grande maioria dos casos de Zika são assintomáticos. Cerca de 20-25% dos indivíduos infectados apresentam sintomas da doença, uma doença branda semelhante a dengue com quadro febril acompanhado manifestações clínicas de dores de cabeça, o qual dura em torno de 7 dias (CDC, 2016; CERBINO-NETO *et al.*, 2016; LAZEAR & DIAMOND, 2016; SONG *et al.*, 2017). Além disso, o paciente infectado com ZIKV pode apresentar artralgia, mialgia e dor retro-orbital. Em alguns casos, apresentam conjuntivite e rash (FLORES *et al.*, 2016).

A grande preocupação em torno da infecção pelo ZIKV nos anos recentes, diz respeito a sua associação a quadros neurológicos como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), em que o próprio sistema imunológico ataca as células nervosas da pessoa, causando fraqueza muscular e, por vezes, paralisia. Além disso, síndromes congênitas do ZIKV que culminam em uma diminuição no tamanho do cérebro de recém-nascidos, associada a degenerações no trato

espinhal e calcificações no córtex cerebral (BRASIL *et al.*, 2016; FLORES *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016). O recente surto epidêmico no Brasil e em outros países da América Latina ilustrou a rapidez com que o ZIKV emergiu (CAMPOS *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015).

1.3.5 Patogênese do ZIKV

Assim como outros flavivírus, é provável que o ZIKV infecte células das glândulas epiteliais e salivares dos mosquitos após a ingestão de sangue de um indivíduo infectado. Após um período de 5-10 dias, o vírus Zika pode ser encontrado na saliva do mosquito, e assim, ser transmitido para humanos.

Quando o mosquito infectado faz o repasto sanguíneo, a saliva infectada deposita o vírus na epiderme e na derme do hospedeiro, o que leva à infecção por ZIKV tanto dos fibroblastos da pele do hospedeiro quanto dos queratinócitos (HAMEL *et al.*, 2015).

Monócitos particularmente CD14⁺ CD16⁺, seguidos das células dendríticas, são os principais alvos de infecção do ZIKV (MICHLMAYR *et al.*, 2017). Já que monócitos podem infiltrar diversos tecidos, incluindo órgãos imunologicamente protegidos, são alvos ideais para infecção, já que podem atuar como “Cavalo de Tróia”. (ANDRADE *et al.*, 2017).

Além disso, a porcentagem de monócitos CD14⁺ CD16⁺ é aumentada durante a infecção pelo ZIKV, e o perfil de expressão gênica de monócitos é geralmente mutado, com baixa indução de citocinas e quimiocinas, consistente com a leve sintomatologia de Zika. (ANDRADE *et al.*, 2017). A identificação das células alvo da infecção por ZIKV no sangue é um importante passo para o entendimento dos estágios iniciais da resposta imune inata.

Ainda não está claro como a infecção por ZIKV alcança sítios imunoprivilegiados dentro do corpo e rompe as barreiras protetoras como a placentária e hemato-testicular, o que leva à transmissão sexual e defeitos congênitos. (D'ORTENZIO *et al.*, 2016). Uma possível rota é por meio dos leucócitos, que poderiam disseminar o vírus para diferentes compartimentos do corpo ou servir como um reservatório, em um mecanismo conhecido como *Trojan Horse* “cavalo de tróia” (SALINAS *et al.*, 2010). Já o vírus do Oeste do

Nilo (WNV – West Nile vírus), outro flavivírus, infecta monócitos e isso contribui para a sua disseminação para o cérebro, resultando em encefalite e meningite (GARCIA-TAPIA *et al.*, 2006; RIOS *et al.*, 2006).

1.4 Coinfecções – Dengue e Zika vírus

Em diversos cenários epidemiológicos, até mesmo no Brasil, ocorre a cocirculação dos vírus Dengue e Zika. Quando ocorre uma infecção sintomática do ZIKV ou do DENV, as manifestações clínicas são semelhantes, embora as pessoas que adoecem com o vírus Zika geralmente tenham sintomas leves. (WHO, 2015).

Um estudo de caso de um paciente com coinfeção de DENV e ZIKV, mostrou que o mesmo teve manifestações mais graves do que as manifestações já descritas para a infecção pelo ZIKV, incluindo artralgias graves e inchaço das articulações. (IOVINE *et al.*, 2016). Embora isso possa simplesmente representar variação individual, é reconhecido que os anticorpos específicos para DENV, podem atuar favorecendo a infecção de ZIKV, pelo menos em um contexto *in vitro*. Sugere-se que a imunidade prévia do DENV intensifica a infecção de ZIKV *in vivo* e pode aumentar a gravidade da doença. (PAUL *et al.*, 2016).

Em um trabalho realizado em Manaus, capital do estado do Amazonas no Brasil, descobriu-se que quase todos os mosquitos *Aedes.aegypti* avaliados foram suscetíveis à coinfeção com ambos os arbovírus – DENV e ZIKV – e que a coinfeção influenciou fortemente a competência vetorial, com transmissão preferencial do ZIKV pela picada do *Aedes.aegypti* ao hospedeiro vertebrado (CHAVES *et al.*, 2018).

Ainda existem poucos trabalhos relatando a imunopatogênese das coinfecções de DENV e ZIKV, e menos ainda, voltados às células *Natural Killer* do sistema imunológico inato.

1.5 Aspectos fenotípicos e funcionais de células *Natural Killer* (NK)

O Sistema Imunológico (SI) consiste em uma organização de células, moléculas, tecidos e órgãos com funções especializadas na defesa de um organismo contra agressores. O SI é constituído por respostas com características biologicamente distintas: a resposta imune inata, uma defesa rápida, robusta e inespecífica contra patógenos; e a resposta imune adaptativa, específica composta por células efetoras especializadas na eliminação de patógenos e na geração de memória imunológica (IWASAKI & MEDZHITOV, 2010).

A primeira linha de defesa do organismo contra os vírus Dengue ou Zika, e qualquer outro vírus ou microorganismo patogênico está na imunidade inata. Ela existe antes do encontro com os microorganismos e é rapidamente ativada por eles, antes mesmo do desenvolvimento das respostas imunológicas adaptativas (BONILLA & OETTGEN, 2010).

As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos citotóxicos que possuem papel essencial na resposta imune antitumoral e antiviral. Como o próprio nome já diz, células NK são “naturalmente” citotóxicas e diferentemente das células T citotóxicas, não necessitam de exposição prévia ao antígeno para realizar suas funções efetoras (SUN & LANIER, 2011). Células NK compartilham algumas similaridades com as células T e B, incluindo a origem de um mesmo progenitor comum linfoide (CLP) e a dependência de citocinas de cadeia gama comum como a IL-2 para o desenvolvimento e atividade efetora (DISANTO *et al.*, 1995; GALY *et al.*, 1995; KONDO & AKASHI, 1997; BEAULIEU, 2018).

As células T se desenvolvem no timo e se tornam ativadas quando seus receptores de células T (TCRs) rearranjados somaticamente encontram antígenos estranhos no contexto das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e ligantes co-estimulatórios expressos em células apresentadoras de antígenos.

Em contraste, as células NK se desenvolvem primariamente fora do timo, em vários outros tecidos, e não expressam TCR. Em vez disso, as células NK são reguladas por numerosos tipos de receptores ativadores e inibidores, não rearranjados, incluindo dois tipos principais de receptores que se ligam a MHC classe I: receptores lectina tipo C evolutivamente conservado e não polimórfico,

e a grande família poligênica e altamente polimórfica de receptores KIR (do inglês *Killer Immunoglobulin-like receptors*) (COLONNA *et al.*, 1999; FREUD *et al.*, 2017).

Dadas as maneiras distintas pelas quais as células T e as células NK são projetadas para responder à expressão de moléculas MHC de classe I (isto é, ativação das células T por meio do TCR e a regulação das células NK através de receptores que reconhecem MHC de classe I), é provável que as células T e as células NK forneçam imunidade complementar contra infecções e câncer, os quais as moléculas de MHC podem ou não ser reguladas negativamente (GRIFFIN *et al.*, 2010; GARRIDO *et al.*, 2017; FREUD *et al.*, 2017).

Além disso, sabe-se que é preciso dias para montar uma resposta robusta de células T (ou seja, resposta adaptativa), estudos recentes sugerem que esta é complementada por uma resposta inata muito mais rápida, em parte mediada por NK células (DEGUINE & BOUSSO, 2013; JAIN & PASARE, 2017).

Contudo, esta é uma visão excessivamente simplificada da interação entre as células T e células NK, já que as células T podem expressar muitos receptores associados a células NK, incluindo receptores de ligação a moléculas MHC de classe I (STRAUSS-ALBEE *et al.*, 2014; DAVIS *et al.*, 2015).

Ademais, estudos têm cada vez mais mostrado que as células NK podem se adaptar através da remodelação epigenética em resposta a exposições ambientais e pode até mesmo formar memória imunológica (O'SULLIVAN *et al.* 2015; TESI *et al.*, 2016).

As células NK representam aproximadamente 10% dos linfócitos humanos circulantes no total de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), e constituem a terceira maior população de linfócitos, após as células B e T (MANDAL & VISWANATHAN, 2014). Morfologicamente, são caracterizadas como linfócitos grandes e granulares, originados na medula óssea e fenotipicamente são definidos, em humanos, como CD56⁺ CD3^{neg}. (MANDAL & VISWANATHAN, 2014).

Acreditava-se que as células NK se desenvolviam exclusivamente na medula óssea. No entanto, evidências recentes em humanos e camundongos sugerem que as NK possam se desenvolver e diferenciar em tecidos linfoides

secundários, incluindo o baço e os linfonodos (SCOVILLE *et al.*, 2017; ABEL *et al.*, 2018).

Em humanos, várias deficiências raras de células NK têm sido descritas (ORANGE, 2002). O primeiro relato foi de um caso de uma jovem que não tinha células NK funcionais e sofreu uma série de infecções virais durante a infância e adolescência, incluindo infecções por múltiplos vírus herpes (BIRON *et al.*, 1989).

Diversos estudos subsequentes têm associado síndromes de imunodeficiência humana que resultam no comprometimento total ou parcial do número e função das células NK, com maior suscetibilidade a infecções virais incluindo vírus herpes simples (HSV), vírus varicela zoster, citomegalovírus (CMV) e vírus do papiloma humano (DE VRIES *et al.*, 1996; JAWAHAR *et al.*, 1996; DE HASS *et al.*, 1996; JOST & ALTFELD, 2013). Esses estudos estabeleceram o papel crítico das células NK funcionais no controle de infecções virais em humanos.

1.5.1 As subpopulações das células NK

As células NK humanas constituem uma população heterogênea de linfócitos CD3^{neg} e são classificadas pela expressão relativa na membrana extracelular de duas moléculas principais: CD56 e CD16 (LANIER *et al.*, 1986a).

O antígeno CD56 ou molécula de adesão neural (NCAM-1) possui função desconhecida nas células NK humanas (LANIER *et al.*, 1989), embora outros estudos sugerem que essa molécula possa mediar interações entre as células NK e as células alvo (NITTA *et al.*, 1989; SUZUKI *et al.*, 1991).

Já o CD16 ou receptor de baixa afinidade de Imunoglobulina gama (FcR γ III) (LANIER *et al.*, 1986b) é um receptor Fc que reconhece e se liga a porção Fc de um anticorpo, como IgG, que tenha se ligado à superfície de uma célula-alvo infectada por um patógeno (opsonização). Uma vez que o receptor se liga ao anticorpo, a célula NK se torna ativa e induz a liberação de proteínas como perforina e granzimas, além da produção de citocinas como IFN- γ , que levam à morte da célula alvo e assim, limitam a disseminação da infecção viral. Esse mecanismo de ação das células NK através do reconhecimento do CD16

à porção Fc de um anticorpo é conhecido como citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) (WANG *et al.* 2015).

Baseado na expressão de CD56 e CD16, as células NK humanas são geralmente divididas em CD56^{bright} CD16^{neg} e CD56^{dim} CD16⁺ (POLI *et al.*, 2009). No sangue periférico, a população CD56^{dim} CD16⁺ constitui a maioria (aproximadamente 90%) das células NK. Esse subtipo produz baixas quantidades de citocinas, embora tenha mostrado ser mais citotóxico do que as células NK CD56^{bright} CD16^{neg}, devido à produção de altos níveis de perforina e granzima, assim como, através da indução de ADCC por meio de CD16 (FREUD *et al.*, 2005; BERAHOVICH *et al.*, 2006; THOREN *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2014).

Já as células CD56^{bright}CD16^{neg} representam a minoria de células NK no sangue periférico (aproximadamente 10%), e diferentemente das CD56^{dim}, estas produzem grandes quantidades de citocinas e exibem baixa citotoxicidade, além de serem maioria nos linfonodos (WALDHAUER, I. & STEINLE, A. 2008.)

As células NK secretam citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ e TNF- α . Essas citocinas são cruciais na amplificação da resposta imune inata devido à ativação de macrófagos e são também importantes para regulação da resposta imune adaptativa. As citocinas regulam a ontogenia, sobrevivência e a proliferação das células NK, a ativação/maturação e a citotoxicidade, sendo as IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 e IFN tipo I, os principais mediadores dessa regulação (ZWIRNER & DOMAICA, 2010).

Yu e colaboradores sugeriram que células NK CD56^{bright} possam se diferenciar em CD56^{dim}, assim, acredita-se que o subtipo CD56^{bright} representa uma forma imatura ou em desenvolvimento das células *Natural Killer* (YU *et al.*, 2010). Dessa forma, as células NK CD56^{bright} se diferenciariam adquirindo expressão de CD56^{dim}, especialmente CD16 e KIR e perderiam a expressão de CD56^{bright} além da redução de CD94 (BEZIAT *et al.*, 2010; EISSENS *et al.*, 2012).

As células acessórias são importantes na regulação das funções efetoras das células NK. Estas induzem a maturação das células dendríticas (Dendritic Cells –DCs) via secreção de TNF- α /IFN- γ e por meio do contato célula–célula. Por outro lado, a produção de citocinas pelas DCs, como por exemplo IFN- α ou IL-15, aumenta a citotoxicidade, proliferação e produção de IFN- γ pelas células

NK. Esta cooperação entre as DCs e as células NK é fundamental na indução da resposta tipo Th1 e citotoxicidade das células T CD8 (WALZER *et al.*, 2005).

O reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *Pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs) pelos receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptors* – TLRs) desencadeia uma complexa cascata de transdução de sinal que irá culminar na produção de citocinas pró-inflamatórias e dos interferons tipo I (IFN- α/β) importantes na defesa antiviral (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004). Essa especificidade para estruturas microbianas faz com que o sistema imune inato possa distinguir o próprio do não próprio. As células NK podem ser ativadas tanto diretamente pelo vírus, mediante o reconhecimento de padrões virais via TLR, quanto indiretamente através de citocinas como a IL-2. Estas células são capazes de reconhecer RNA viral de dupla fita e de fita simples, além de expressarem receptores TLRs como: TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 (SIVORI *et al.*, 2004; HART *et al.*, 2005).

1.5.2 Mecanismos de inibição ou ativação das células NK

As células NK expressam uma grande variedade de receptores de superfície, que não sofrem rearranjo gênico e que podem ser ativadores ou inibidores da citotoxicidade. (LONG *et al.*, 2013). Existem diversas famílias de receptores que apresentam tanto receptores inibitórios quanto receptores ativadores. Os principais receptores descritos pertencem as famílias dos KIR (receptores semelhantes a imunoglobulina de células “Killer”), CD94/NKG2 (receptores de lectina do tipo C) e NCRs (receptores de citotoxicidade natural) (LONG *et al.*, 2013).

O balanço dinâmico entre receptores de ativação e inibição é responsável por determinar tanto a função efetora citotóxica das células NK de lisar as células alvo, quanto a produção de citocinas. Esses receptores possuem estratégia altamente sofisticada para evitar danos em células normais, ao mesmo tempo que identificam potenciais células alvo (VIVIER *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008). Estes receptores são divididos em duas classes principais – inibidores ou ativadores - de acordo com sua influência nas células NK.

Primeiramente, em relação aos receptores inibitórios, sabe-se que as células NK humanas expressam diversas famílias desses receptores que especificamente identificam a expressão de moléculas MHC classe I clássicas e não clássicas em células alvo, e permitem que as células NK possam discriminar células normais de células infectadas ou doentes de acordo com a hipótese “missing-self” (LJUNGGREN, H. G. & KARRE, 1990; KARRE, 2008) (Figura 5). Esses receptores inibitórios geram sinais de supressão que impedem a atividade das células NK e podem se ligar a diferentes grupos alélicos de moléculas HLA-I expressas em células alvo (YOON *et al.*, 2007).

Já os receptores ativadores, estimulam as células NK a lisar células alvo que não possuem moléculas MHC-I na sua superfície (JAMIESON *et al.*, 2004). Células tumorais ou infectadas por vírus diminuem a expressão de MHC-I para escapar do reconhecimento e morte pelas células T citotóxicas (REEVES & JAMES, 2917; LIU, 2009). Assim, os receptores de células NK podem ser classificados de acordo com sua função ou de acordo com a família a qual pertencem.

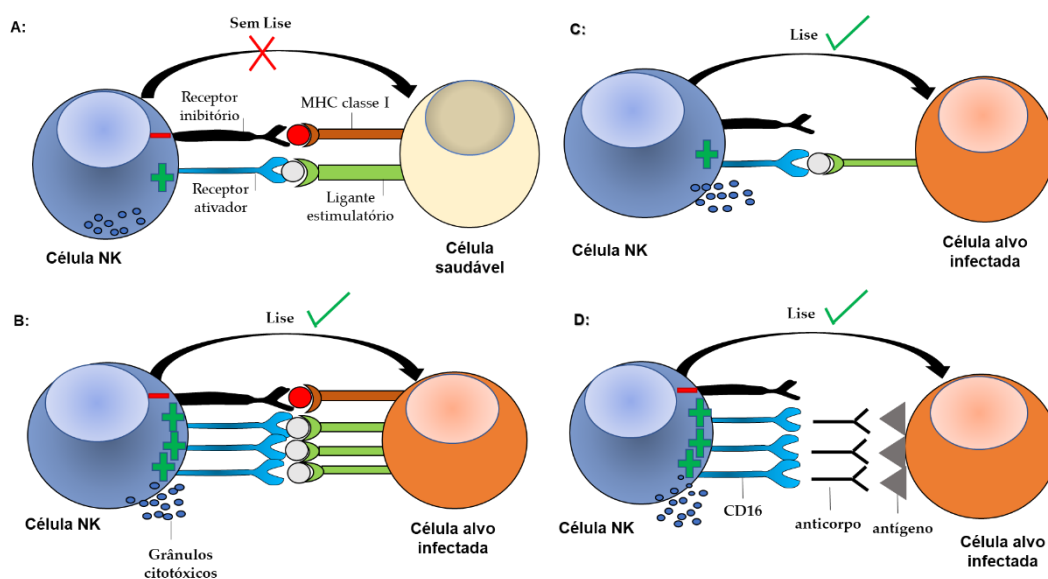


Figura 1.4.1: Representação esquemática das funções fisiológicas das células NK. (A) O balanço entre os sinais ativadores e inibitórios regulam o reconhecimento das células saudáveis pelas células NK. (B) As células tumorais ou infectadas por vírus podem superexpressar ligantes que são reconhecidos pelos receptores de ativação das células NK que anulam os sinais inibitórios e induzem a lise das células alvo (C) Representação da hipótese “missing self”. As células tumorais ou infectadas por vírus podem também diminuir, regulando negativamente, a expressão de moléculas MHC classe I que são detectadas como “missing self” e sofrem lise pelas células NK. Quando células alvo não expressam na superfície celular moléculas MHC classe I, a ligação de receptores ativadores aos seus ligantes na célula alvo, na

ausência de sinais inibitórios, induz a ação efetora das células NK, por exemplo, via liberação de grânulos citotóxicos. **(D)** Representação da ADCC. Quando a molécula CD16 reconhece a porção Fc de um anticorpo acoplado em um antígeno na superfície da célula alvo infectada, isso induz a ativação das células NK e assim, a degranulação. Adaptado de MORVAN & LANIER, 2016.

O balanço entre os sinais ativadores e inibitórios integra o mecanismo de ativação das células NK. Quando a integração desses sinais atua em favor da ativação, desencadeia a função efetora das células NK que é caracterizada pela produção de mediadores solúveis inflamatórios e, principalmente, pela citotoxicidade às células alvo. A citotoxicidade ocorre por meio da liberação de grânulos citotóxicos pelas células NK, o que permite a apoptose de células alvo, mecanismo dependente da secreção de granzima/perforina ou expressão de TRAIL/FASL na superfície celular (KRZEWSKI & COLIGAN, 2012). As perforinas são proteínas que formam poros na membrana das células-alvo que podem perturbar a permeabilidade e levar a lise osmótica. Ao mesmo tempo que ajuda a permitir a apoptose mediada por granzimas (OSINSKA *et al.*, 2014).

Os receptores ativadores das células NK se ligam aos ligantes expressos na superfície das células alvo e estimulam as células NK para lisar as células alvo. Por outro lado, os receptores das células NK reconhecem moléculas MHC classe I (HLA-I) na superfície das células alvo, e essa interação inibe a lise das células alvo, sobrepondo os efeitos dos receptores ativadores. O sinal inibitório é perdido quando as células alvo diminuem ou perdem a expressão de moléculas MHC classe I, como é no caso de células tumorais ou infectadas por vírus, que possuem essa estratégia para escapar do reconhecimento e da destruição pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs) (IGNEY & KRAMMER, 2002; REVILLEZA *et al.*, 2011; STADNISKY *et al.*, 2011).

Assim, o engajamento de receptores ativadores e inibitórios com seus ligantes determina se a célula NK vai atuar de forma efetora ou não. Geralmente, há três estágios que envolvem a interação das células NK com a célula alvo até levar à morte por apoptose. O primeiro estágio é a ligação da célula NK a célula alvo por meio de um painel de receptores ativadores e moléculas de adesão, como LFA-1 que reconhecem estruturas na superfície da célula alvo (PIETRA *et al.*, 2012). De acordo com a hipótese *missing-self*, as células NK levam a morte da célula alvo por meio da ausência de sinais inibitórios devido à perda ou diminuição da expressão de moléculas MHC-I nas células alvo (KARRE, 2008).

O segundo estágio envolve o desencadeamento de uma cascata de sinais de ativação intracelular na célula NK, levando ao movimento dos grânulos citotóxicos em direção à superfície da célula NK. Em terceiro lugar, a liberação de proteínas citotóxicas dos grânulos citotóxicos para sinapse imunológica e, conseqüentemente para as células alvo, com objetivo de facilitar a morte da célula alvo (LANIER, 2003, MACE *et al.*, 2012).

Células NK ativadas também aumentam a expressão de Fas ligante (FasL), que reconhece Fas na superfície das células alvo, e essa interação leva a apoptose da célula alvo (NAGATA & SUDA, 1995). Estudos demonstraram que FasL é estocado na membrana do grânulo citotóxico e então, realocado para a superfície da célula efetora em processo de degranulação (BOSSI & GRIFFITHS, 1999, HE & OSTERGAARD, 2007).

1.5.3 Papel das células NK durante a imunopatogênese do DENV e ZIKV

Flavivírus como DENV e ZIKV induzem o aumento na expressão de moléculas MHC classe I, e isso diminui a detecção das células infectadas pelas células NK, já que o aumento dessas moléculas MHC interage eficientemente com receptores inibitórios das NK (YOSSEF *et al.*, 2012; YE *et al.*, 2013; JOST & ALTFELD, 2013). Já foi descrito que a maior consequência biológica do aumento de moléculas MHC classe I induzidos pelo DENV é a diminuição drástica da atividade citotóxica das células NK, conforme mostrado em ensaios de citotoxicidade *in vitro* (HERSHKOVITZ *et al.*, 2008; KURANE, *et al.*, 1984).

O aumento da ativação das células NK na imunopatogênese da dengue vem sendo associado com bom prognóstico, sugerindo um papel protetor. Azeredo e col. (2006) mostraram que o aumento da expressão de células NK CD69⁺ (CD69 - marcador de ativação tanto de células T, B, quanto de NK) está associado à forma branda da dengue (AZEREDO *et al.*, 2006). Já nos pacientes com a Síndrome do Choque do Dengue, análises genômicas mostraram que aspectos funcionais das células NK estariam diminuídos nestes indivíduos (DEVIGNOT *et al.*, 2010).

Estudo *in vitro* utilizando células NK humanas autólogas mostrou que células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs) infectadas com DENV,

mas não monócitos, ativam células NK de maneira dependente de contato, resultando no aumento da expressão de CD69 e secreção de IFN- γ (COSTA *et al.*, 2017). Além disso, este mesmo trabalho mostrou que o bloqueio de moléculas de adesão (LFA-1, DNAM-1, CD2 e 2 β 4) em cocultura de células NK e MDDCs infectadas pelo DENV, aboliu a ativação das células NK assim como a secreção de IFN- γ e o controle da replicação do DENV.

Outro estudo *in vitro* mostrou o aumento na expressão de HLA-E após a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV em células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1). No entanto, a infecção pelo ZIKV não aumentou a expressão de HLA-E (DREWS *et al.*, 2018; MICHLMAYR *et al.*, 2017).

Um trabalho recente desenvolveu um modelo murino sintomático da infecção ocular pelo ZIKV, no qual por meio da extração de RNA e técnica RT-PCR das amostras de olho coletadas em diferentes idades após a infecção pelo ZIKV, verificou-se o aumento na expressão relativa de TNF- α , IFN- γ , granzima e perforina. Aumento esse, que não foi acompanhado pelo aumento da expressão de marcadores de células T (CD3 e CD8), sugerindo que outras células, possivelmente as células NK, poderiam alcançar o olho infectado dos camundongos no início da doença (MANANGEESWARAN *et al.*, 2018).

Cada vez mais surgem novas evidências de que os monócitos CD14⁺ seriam os principais alvos durante a infecção pelo ZIKV (FOO *et al.*, 2017). Recentemente, Lum e colaboradores (LUM *et al.*, 2018) mostraram que a atividade das células NK foi diretamente dependente da presença de monócitos CD14⁺ na infecção *in vitro* pelo ZIKV. As PBMCs de doadores saudáveis foram depletadas de monócitos CD14⁺, o que diminuiu significativamente a expressão dos vários marcadores de ativação das células NK, demonstrando o papel funcional dos monócitos como um dos principais fatores para a estimulação das células NK (LUM *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Há mais de 30 anos, o Brasil vem sofrendo o impacto de epidemias causadas pelos DENV, desde a introdução do DENV-1 em 1986. No caso da infecção pelo ZIKV, após anos restritos a certas áreas do globo terrestre, causando casos esporádicos em humanos, o ZIKV se tornou emergência de saúde pública no Brasil e no mundo.

As infecções causadas pelo ZIKV foram acompanhadas por um aumento nos casos da Síndrome de Guillain-Barré, concomitantemente com complicações fetais como a microcefalia. Além disso, devido à cocirculação dos dois vírus, casos de pacientes comprovadamente coinfectados pelo DENV/ZIKV já foram reportados.

A redução do número de casos confirmados para o ZIKV em 2017 até os dias atuais, dificultou a realização de estudos utilizando pacientes naturalmente infectados por este vírus. Neste sentido, ensaios *in vitro* utilizando células alvo infectadas pelo ZIKV constituem uma ferramenta fundamental na elucidação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção pelo ZIKV. Ainda é desconhecido o desfecho clínico em pacientes coinfectados e o risco potencial de desenvolvimento de formas clínicas mais graves.

Até o momento, existem poucos estudos abordando a resposta imune em pacientes infectados pelo ZIKV, e menos ainda com pacientes coinfectados, enfatizando a importância dos estudos propostos neste projeto. Em contrapartida, a resposta imune adaptativa é bastante estudada na infecção pelo DENV, porém até o momento estudos abordando a resposta imune inata em pacientes naturalmente infectados ainda são escassos.

As células NK são as principais efetoras da imunidade inata e no controle das infecções virais. De uma forma geral, estudos anteriores demonstraram a maior frequência de células NK CD3^{neg} CD56⁺ em pacientes brandos mostrando que a infecção pelo DENV tem impacto nos números das células NK totais na fase aguda. Em relação ao ZIKV, apenas um estudo abordou a frequência de células NK em pacientes infectados, e não existem, até o momento, estudos em pacientes coinfectados pelo DENV e ZIKV.

Ensaio funcionais que possam contribuir no conhecimento do papel de células do sistema imune inato tanto na infecção pelo DENV quanto pelo ZIKV, principalmente no que diz respeito as células NK ainda são necessários.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo estudar o perfil fenotípico e funcional das células *Natural Killer* (NK) em pacientes mono infectados e co infectados pelos vírus Dengue e Zika.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência *ex vivo* das diferentes subpopulações de células NK, em pacientes mono e co infectados pelo DENV e ZIKV e *in vitro*, em cocultura de monócitos infectados e células NK;
- Analisar a expressão *ex vivo* de perforina e CD62L nas subpopulações de células NK;
- Quantificar citocinas séricas em pacientes mono e co infectados pelo DENV ou ZIKV ;
- Cocultura de monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV e células NK na presença de IL-2;
- Determinar os aspectos funcionais e fenotípicos das células NK humanas durante cocultura com monócitos infectados pelo DENV e ZIKV;
- Avaliar a frequência total de monócitos infectados e células NK em cocultura após a infecção pelos vírus Dengue ou Zika.

4 METODOLOGIA

4.1 População de estudo

Em 2016 foram estudados casos suspeitos de infecção pelos arbovirus dengue, zika e chikungunya com até uma semana após o início dos sinais e sintomas da doença, entre o período de fevereiro a junho de 2016. Através da colaboração com os médicos Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha na UPA Coronel Antonino em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, e Dr. Paulo Vieira Damasco no Hospital Rio-Laranjeiras, Rio de Janeiro, o laboratório de Imunologia Viral coletou cerca de 200 amostras. Os dados clínicos e epidemiológicos destes estudos já estão publicados (AZEREDO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

Neste estudo analisamos 81 casos que apresentaram diagnóstico laboratorial de infecção pelo DENV, ZIKV e ou coinfectados com DENV e ZIKV. Ainda foram incluídas amostras de indivíduos clinicamente saudáveis (n=10) que não apresentaram episódios febris nos últimos 3 meses ou comorbidades. Dez amostras negativas para DENV, ZIKV e CHIKV coletadas durante o estudo foram também analisadas com grupo acometido por outras doenças febris (ODF).

Toda caracterização clínica dos pacientes foi realizada. Os casos confirmados em pacientes com infecção pelo DENV foram classificados segundo a classificação clínica da OMS, 2009. Já os casos confirmados de infecção pelo ZIKV foram classificados de acordo com o Ministério da Saúde, 2016.

De acordo com a **Tabela 4.1**, podemos observar que a maioria dos pacientes com dengue apresentaram a forma branda da doença, dengue sem sinais de alarme (DSSA). Da mesma forma, os pacientes coinfectados pelos vírus Dengue e Zika em sua maioria apresentaram a forma clínica DSSA.

Pacientes monoinfectados pelo ZIKV apresentaram sinais clínicos como febre, exantema, prurido e não foram observadas complicações ou manifestações neurológicas. Da mesma forma, não foram observadas complicações ou manifestações neurológicas nos pacientes coinfectados pelos vírus Dengue e Zika (AZEREDO *et al.*, 2018).

De acordo com os dados demográficos dos casos confirmados de infecção pelo DENV, 55% foram mulheres e 45% homens. A média da idade foi

de 37 anos. Em relação aos casos confirmados de Zika, 59% foram mulheres e 41% homens, e a média da idade foi de 39 anos. Em relação aos pacientes coinfectados pelo DENV e ZIKV, podemos observar que 42% foram mulheres e 58% homens, e a média da idade foi de 34 anos. O principal sorotipo do vírus Dengue foi DENV-1 tanto nos casos infectados pelo DENV como nos coinfectados.

A aquisição dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais foi feita no momento da consulta do paciente pelo médico e pesquisador em que foi preenchido o formulário, seguido da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nas amostras de sangue de casos suspeitos foi realizado o diagnóstico laboratorial confirmatório de infecção pelo DENV, e ou ZIKV.

Tabela 4.1: Dados demográficos, laboratoriais e clínicos dos pacientes infectados pelo DENV e/ou ZIKV.

Características	DENV n = 40	ZIKV n = 22	DENV e ZIKV n = 19	ODF n = 10
Idade	37,6 ± 18,1	39,5 ± 11,2	34,7 ± 17,8	39,8 ± 18
Sexo (Masculino:Feminino)	18:22	9:13	11:8	3:7
Dias de doença	4,5 ± 3,7	3,4 ± 1,7	3,6 ± 1,8	2,9 ± 0,8
Febre	38/40 (95%)	20/22 (90%)	14/19 (73%)	9/10
Sorotipo de DENV:				
DENV-1	36/40, 90%	-	18/19, 94,7%	
DENV-4	4/40 (10%)	-	1/19 (5,2%)	
Classificação OMS, 2009:				
DSSA	33/40 (82%)	-	16/19 (84%)	
DCSA	6/40 (15%)	-	3/19 (15,7%)	
GRAVE	1/40 (2,5%)	-	0/19	
Hospitalização	4 (0,1%)	1 (0,45%)	2 (0,11%)	0/10
Cormorbidades:				
Hipertensão arterial	5/40 (15%)	4/22 (18%)	4/19 (21%)	0/10
Outras comorbidades	5/40 (15%)	5/22 (22%)	4/19 (21%)	4/10

População de estudo com 91 pacientes, 40 monoinfectados pelo DENV, 22 monoinfectados pelo ZIKV, 19 coinfectados pelo DENV e ZIKV, além de 10 pacientes com outras doenças febris (ODF) com diagnóstico negativo para DENV e ZIKV. Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. Dias de doença corresponde ao dia do início dos sintomas até o momento em que o paciente foi entrevistado. Outras comorbidades incluem rinite, asma brônquica, sinusite e artrite reumatoide. As idades e dias de doença foram representadas pelas médias aritmética dentro de cada grupo.

4.2 Diagnóstico laboratorial

Metodologias sorológicas e moleculares foram utilizadas no diagnóstico diferencial de infecção pelo DENV, ZIKV e CHIKV.

Para o diagnóstico laboratorial de infecção pelo DENV foram utilizados o kit Panbio Dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália), o Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA), e o ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA). A detecção molecular e tipagem dos sorotipos foi realizada de acordo com Lanciotti *et al.* (1992), além do protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Johnson *et al.* (2005). O diagnóstico de dengue foi confirmado pela positividade de pelo menos um dos seguintes métodos descritos acima.

Para a investigação de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV as amostras foram testadas para ZIKV pela metodologia de RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti *et al.* (2008). Não foram realizados métodos sorológicos na investigação de casos suspeitos de ZIKV devido reatividade cruzada deste vírus com outros *Flavivirus*. O diagnóstico de Zika foi confirmado pela positividade através da RT-PCR em tempo real (LANCIOTTI *et al.*, 2008).

Todas as amostras foram submetidas às metodologias sorológicas e moleculares para o diagnóstico de CHIKV pelo teste “padrão-ouro” ELISA de captura de IgM anti-CHIKV de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (2014), kit Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha), RT-PCR para detecção do CHIKV descrito por Lanciotti *et al.* (2007).

Esse estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética para os estudos em pacientes infectados pelo DENV (Sistema Plataforma Brasil número CAAE 13318113.7.3001.0021) e pelo ZIKV e CHIKV no Comitê de Ética em Pesquisa: CAAE-57221416.0.1001.5248, Plataforma Brasil.

Além da caracterização fenotípica das células NK de pacientes naturalmente infectados pelos arbovírus DENV e ZIKV, este projeto também investigou a interação das células NK com monócitos infectados *in vitro*. O desenho experimental exemplificando cada etapa utilizada neste presente trabalho está descrito no fluxograma a seguir, na Figura 4.1.

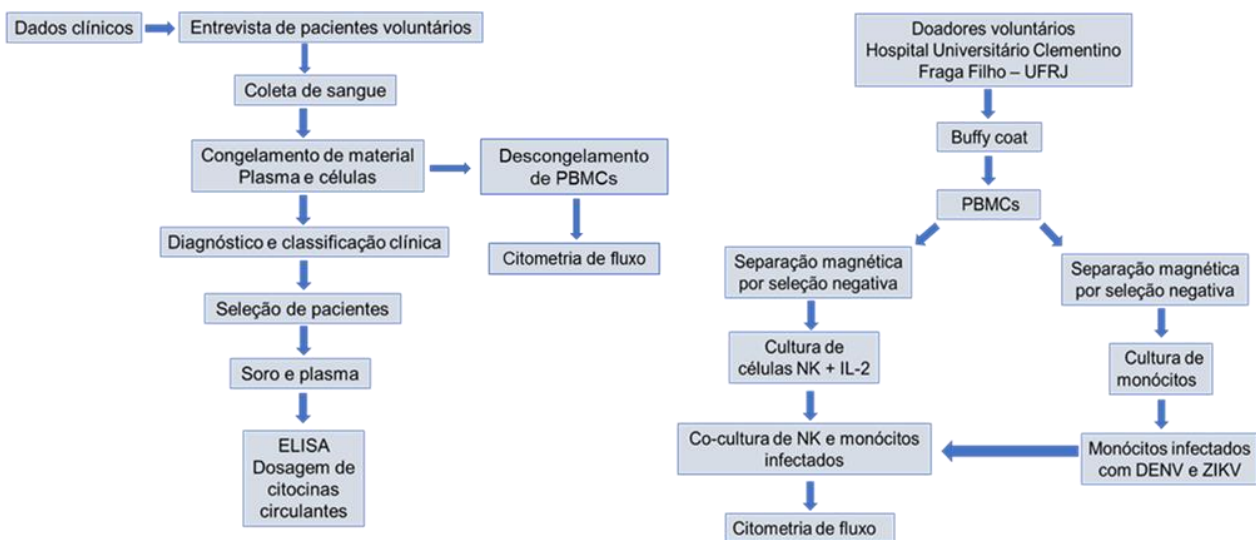


Figura 4.1: Fluxograma do desenho experimental para estudo do perfil fenotípico e funcional das células NK na resposta imune anti-DENV e anti-ZIKV em pacientes naturalmente infectados e em cocultura de células NK e monócitos infectados *in vitro*.

4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Foram coletados cerca de 20 mL de sangue venoso periférico de pacientes em tubos contendo anticoagulante ACD (BD Vacutainer®, catálogo #364606) para obtenção de PBMC e plasma. As PBMCs (do inglês: “*Peripheral blood mononuclear cells*”) foram isoladas do sangue através do gradiente de densidade de Ficoll-Histopaque™ (Sigma).

O sangue foi inicialmente colocado sobre 15 mL de Ficoll-Histopaque, em seguida os tubos foram centrifugados a 400 x g por 30 minutos a temperatura ambiente em centrífuga sem freio. Após a centrifugação, as PBMCs foram recuperadas e lavadas duas vezes com PBS-SFB e a suspensão final foi ressuspensa em meio HBSS suplementado com 1mM de EDTA e 2% de SFB, e as células foram contadas na câmara de Neubauer ou no contador de células automático (BIO-RAD modelo TC20)

A viabilidade celular foi avaliada previamente pelo corante de exclusão Azul de Trypan e as células foram congeladas para estudos posteriores. As alíquotas contendo de 10^6 - 10^7 células viáveis foram criopreservadas em solução

de congelamento com 10% de DMSO (Sigma #108K01865) e 90% SFB (Gibco, Invitrogen Co., catálogo #12657-029), armazenadas inicialmente a -70°C por 24 horas e em seguida, repassadas para o nitrogênio líquido até sua utilização. O soro foi separado, aliquotado e armazenados à -70°C para análises posteriores. Para realização dos ensaios *ex vivo*, as PBMC criopreservadas foram descongeladas a 37°C e lavadas com meio HBSS suplementado com 1mM de EDTA e 2% de SFB.

4.4 Fenotipagem de células NK dos pacientes por citometria de fluxo

De forma a investigar mudanças fenotípicas associadas à ativação de subpopulações de células NK do sangue periférico de pacientes infectados pelo DENV e ou ZIKV, foram realizados protocolos já bem estabelecidos pelo nosso grupo de marcação intracelular e de superfície celular por citometria de fluxo (AZEREDO *et al.*, 2006; GANDINI *et al* 2017).

As PBMCs foram descongeladas e as células foram contadas com o contador de células automático (BIO-RAD modelo TC20). Após a adição das células nos tubos de citometria, as mesmas foram centrifugadas a 350 x g por 7 minutos a 4°C e posteriormente, foi descartado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 100µL de bloqueio (PBS 1x / SFB 2% / EDTA 1mM e plasma inativado) e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Depois disso, as células foram lavadas com 400µL de tampão de lavagem (PBS 1x / SFB 2% / EDTA 1mM) e submetidas a marcação de superfície com a adição de anticorpos monoclonais anti-CD3, -CD56, -CD16, -CD62L, -CD4, -CD8. Após a incubação por 30 minutos a 4°C, as células foram novamente lavadas com tampão de lavagem e fixadas com PFA 2%. Foi realizada aquisição de pelo menos 10.000 – 20.000 células no gate de linfócitos utilizando o citômetro FACSAria IIu (BD Biosciences da Plataforma de Citometria, RPT08A-RJ-Fiocruz).

Além disso, foi realizada a marcação intracelular de perforina. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes em tampão contendo PBS-EDTA e permeabilizadas durante 20 minutos com 100µL de *Cytofix/Cytoperm* (BD Bioscience). Em seguida, depois de terem sido lavadas duas vezes com 100µL de tampão *Perm/Wash* (BD *Perm/Wash*[™] *Buffer*), as células foram coradas com

o anticorpo anti-perforina Alexa Fluor 488 da BioLegend (Clone dG9). Finalmente, as células foram lavadas duas vezes e fixadas em PFA 2%. As análises foram realizadas usando o Flow Jo software, version 10 (TreeStar, Inc., Ashland, OR, USA).

4.5 Obtenção de partículas virais

Para os ensaios de infecção *in vitro*, foram utilizados estoques virais do sorotipo DENV-2, genótipo Sudeste Asiático e cepa brasileira da linhagem II . Já o ZIKV foi doado pelo Dra. Ana Bispo do Laboratório de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ, isolado de um paciente com Zika.

Para a produção de massa viral do ZIKV, foram utilizadas células Vero (*African green monkey kidney vero cell line*) suplementadas em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco Thermo Fisher Scientific), suplementados com 0,3% de triptose fosfato (Sigma Aldrich), 0,75 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich), 1,4 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais (Lonza) e 10% ou 2% de SFB) a 37°C. A amostra sérica com diagnóstico positivo de infecção pelo ZIKV foi diluída em meio (MOI 0.1) e inoculada na monocamada confluenta. A presença de partículas virais infecciosas foi acompanhada através da observação de efeito citopático e posteriormente confirmadas pela PCR em tempo real.

4.6 Purificação de partículas virais

Primeiramente, é necessário clarificar a amostra para remover qualquer debrí celular do sobrenadante das culturas celulares infectadas com vírus ou não. O conteúdo das garrafas de cultura, após 7 dias de infecção, foi vertido em um tubo falcon de 50 mL. Cada garrafa em um tubo falcon diferente. As células foram centrifugadas a 1000g a 25°C por 10 minutos. Foi feito um pool das garrafas infectadas e das garrafas não infectadas (mock). Foi adicionado uma solução crioprotetora (SFB) para a partícula viral, deixando o volume de vírus ou mock a ser ultracentrifugado com 10% de SFB. O volume de vírus foi distribuído

nos tubos de ultracentrifugação (Beckman Coulter) previamente lavados e anteriormente deixados overnight no fluxo com luz ultravioleta ligada. Os tubos de ultracentrifugação foram tarados em uma balança de precisão para obter pesos equivalentes com precisão de pelo menos duas casas decimais.

A ultracentrifugação foi realizada a 100.000 x g por uma hora a 4°C. Após a ultracentrifugação, foi retirado o rotor da centrífuga cuidadosamente para não soltar o sedimento celular. O sedimento celular foi ressuspendido em 500 µL de meio RPMI em cada tubo. Em seguida, o vírus ultracentrifugado foi filtrado utilizando seringa de 1 mL e filtros de 0,22 µm. Após filtrar, foram feitas alíquotas de 100 µL e congeladas no freezer -70°C.

4.7 Isolamento de células NK humanas

Para a realização da purificação de células NK humanas, foi utilizado o kit comercial de separação magnética por seleção negativa da STEMCELL (EasySep StemCell Technologies). Após obtenção das PBMCs a partir de *buffy coat* e posterior contagem, foi realizada uma lavagem com o tampão de purificação de células NK (HBSS contendo 2% SFB e 1mM EDTA) e a concentração ajustada para 5×10^7 células/mL em um tubo de citometria de 5 mL estéril. Foi adicionado 50 µL de Human NK Cell Enrichment Cocktail no tubo de citometria com a suspensão celular.

Em seguida, foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. As partículas magnéticas (D Magnetic Particles) foram vortexadas por 30 segundos até a suspensão ficar homogênea. Foi adicionado 100 µL de partículas magnéticas no tubo com a suspensão celular. A suspensão celular foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. O volume foi completado até 3 mL com o tampão de purificação de células NK, homogeneizado e colocado o tubo no ímã magneto por 2,5 minutos.

Posteriormente, o tubo de citometria foi invertido em um novo tubo de citometria coletor, onde estarão as células NK purificadas. O tubo coletor foi novamente colocado no ímã magneto por 2,5 minutos para garantir a pureza das células NK, e ao final, tubo foi invertido em um tubo falcon de 15 mL. O

sobrenadante foi centrifugado a 350 x g por 8 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em meio com soro e foi realizado a contagem das células NK purificadas. A pureza das células NK após o protocolo de purificação foi confirmada pela citometria de fluxo com pureza acima de 90% conforme os dados do fabricante do kit de separação magnética, por meio da marcação de superfície celular utilizando anticorpos monoclonais anti-CD56 e anti-CD14 respectivamente.

4.8 Isolamento de monócitos humanos

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas a partir de bolsas de fase leucocitária - *buffy coat* - de doadores saudáveis, através da colaboração com o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. As PBMCs foram isoladas do sangue através do gradiente de densidade de Ficoll-Histopaque™ (Sigma) de maneira similar ao descrito no item 4.2. Foram realizados testes sorológicos para Sífilis, Chagas, Hepatites virais, anti-HIV-1 e 2 e anti-HTLV-1 e 2, no hospital da coleta para a avaliação de cada amostra. Após obtenção das PBMCs e posterior contagem, foi realizada uma lavagem com o tampão de purificação de monócitos (meio HBSS contendo 2% SFB e 1mM EDTA) e a concentração ajustada para 5×10^7 células/mL.

A purificação ou isolamento de monócitos humanos foi realizada utilizando kits comerciais de separação magnética por seleção negativa (Dynabeads, Invitrogen ThermoFisher Scientific). Primeiramente, foi realizado a lavagem das beads: vórtex por 30 segundos até ficar uniforme e homogênea. Foram transferidos 400 µL de bead para um tubo de citometria de poliestireno de 5 mL. E foi adicionado 1 mL do tampão de purificação de monócitos e colocar o tubo no ímã magneto por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, o tubo foi removido do magneto e as beads aderidas nas laterais do tubo foram ressuspendidas em 400 µL de tampão de purificação. Foi adicionado 100 µL de reagente de bloqueio no tubo de citometria com a suspensão celular.

Em seguida, foi adicionado 100 µL do coquetel de anticorpos presente no kit comercial que atua por seleção negativa, a favor da depleção de células T, B,

dendríticas, NK, eritrócitos, granulócitos e macrófagos. Após homogeneizar, incubar por 20 minutos a 4°C. Depois, foi adicionado 4 mL de tampão e centrifugado a 350g por 8 minutos a 4°C. Sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão em tubo de citometria de 5 mL. Foi adicionado 400 µL das beads lavadas anteriormente no tubo de citometria com a suspensão celular e incubado por 15 minutos a 4°C. Foi adicionado 4 mL de tampão e homogeneizado. Em seguida, foi colocado o tubo no imã magneto por 2 minutos. As células foram coletadas em um tubo cônico de 50 mL. Novamente foi adicionado 4 mL de tampão e colocado no imã magneto por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado no mesmo tubo coletor de 50 mL da etapa anterior, e centrifugado a 350 x g por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensado em meio sem soro para contagem dos monócitos.

4.9 Infecção de monócitos humanos pelos vírus Dengue ou Zika

Após o isolamento de monócitos humanos, foram plaqueados em meio RPMI suplementado com 20 mM HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB. O número de monócitos variou de acordo com o protocolo (1×10^5 a 1×10^6 por poço) e as células foram cultivadas em placas de 24 ou 96 poços com volume final de 200 µL. Os monócitos foram infectados com 30 µL de vírus ultracentrifugado DENV ou ZIKV de acordo com o protocolo já estabelecido pelo laboratório (AZEREDO *et al.*, 2010; GANDINI *et al.*, 2013). A adsorção viral durou 150 minutos (2 horas e 30 minutos) e após esse período, o meio foi retirado e em seguida, repostado com meio RPMI suplementado.

4.10 Cocultura de células NK com monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV

Após a purificação dos monócitos e posterior contagem dos mesmos, 1×10^5 monócitos foram plaqueados em uma placa de 96 poços e infectados com 30 µL de vírus ultracentrifugado DENV-2 ou ZIKV. A adsorção viral durou 150

minutos (2 horas e 30 minutos) e após esse período, o sobrenadante foi descartado um a um com uma pipeta automática, e adicionado novamente meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e incubado na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48h.

Depois de realizada a purificação das células NK, 2x10⁵ células foram plaqueadas na presença de 50U de IL-2 (placa de 96 poços). Após 48h, foi realizada a cocultura das células NK ativadas com os monócitos previamente purificados e infectados pelo DENV-2 ou ZIKV. Todo o conteúdo da placa de monocultura das células NK foi transferido para a placa de monocultura dos monócitos infectados. A cocultura teve duração de 4 horas, e logo em seguida, a placa foi colocada dentro da geladeira por 30 minutos para desprender os monócitos aderidos no fundo da placa. Logo depois, as células foram removidas lentamente do poço da placa com auxílio de uma pipeta automática e transferidas para os tubos de citometria.

A proporção de células NK e monócitos utilizada na cocultura foi de 2:1, respectivamente, ou seja, duas vezes mais células NK do que monócitos infectados. Tanto essa proporção, quanto o tempo de análise pós-infecção (48h), foi padronizado de acordo com estudo de Vivian Vasconcelos Costa (COSTA *et al.*, 2017). Neste estudo, os autores observaram que a cocultura de células NK com MDDCs infectadas pelo DENV-2 na proporção de 1:1 mostrou-se menos capaz de ativar as células NK, em comparação com maiores proporções das células NK em comparação com as células alvo. Assim, optamos por adotar a proporção de 2:1, com 200.000 células NK para 100.000 monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV em cocultura.

4.11 Imunofenotipagem de superfície e intracelular por citometria de fluxo

Os sobrenadantes das culturas de monócitos de doadores saudáveis, previamente infectados pelo DENV-2 ou ZIKV, foram recolhidos após centrifugação da cocultura e armazenados a -70°C para posterior dosagem dos mediadores inflamatórios, por ELISA, e determinação da carga viral, por RT-PCR para DENV (JOHNSON *et al.*, 2005) e ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008).

A marcação de superfície e intracelular por citometria de fluxo foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido em (AZEREDO *et al.*, 2010).

A marcação de superfície para citometria de fluxo foi inicialmente realizada ao adicionar 400 µL de solução de lavagem para citometria (PBS 1x contendo 2% SFB e 1mM EDTA) ao sedimento celular, com posterior ressuspensão com uso do vórtex. A suspensão celular foi centrifugada a 350g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 100 µL de solução de bloqueio (PBS – 1mM EDTA – 1% BSA – 5% plasma inativado). Após homogeneizado com auxílio do vórtex, foi incubado por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado 400 µL de solução de lavagem, homogeneizado, centrifugado e descartado o sobrenadante. Logo depois, foi adicionado o coquetel de anticorpos e incubado por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, foi novamente adicionado 400 µL de solução de lavagem, homogeneizado, centrifugado e descartado o sobrenadante. O sedimento celular foi homogeneizado com auxílio do vórtex, adicionado 100 µL de PFA 2% e incubado por 20 minutos a 4°C. Seguidamente, foi realizada a última lavagem, em que foi adicionado 400 µL de tampão de lavagem, homogeneizado, centrifugado e descartado o sobrenadante. Por último, foi adicionado 150 µL de solução de citometria e após homogeneizado, foi para o citômetro ler cada um dos tubos marcados e não marcados.

Tabela 4.2. Painel de anticorpos monoclonais para marcação de superfície e intracelular por citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Catálogo	Fabricante
CD56	PE	MEM-188	304606	BioLegend
CD62L	AF700	DREG-56	304820	BioLegend
CD14	PerCP	HCD14	325632	BioLegend
CD16	PECy7	3G8	302016	BioLegend
CD3	APC CY7	SK7	557832	BD
NKp44	AF647	P44-8	355112	Biolegend
CD69	PerCP	L78	340548	BD
Perforina	AF 488	dG9	308108	BD

4.12 Quantificação de citocinas séricas por ELISA

As citocinas (TNF- α , IFN- γ , IFN- α , IL-6, IL-12 e IL-15) foram quantificadas no soro de pacientes com diagnóstico confirmado para DENV ou ZIKV e doadores saudáveis, utilizando kits comerciais de ELISA e de acordo com as especificações do fabricante BD e R&D Systems, Peprotech.

Tabela 4.3. Kits comerciais de ELISA para quantificação das citocinas.

Citocinas	Fabricante	Catálogo	Lote
TNF- α	PeprTech	900-TM25	0414T025-M
IFN- γ	RD	DY282	1345595
IFN- α	Invitrogen	BMS217	177937051
IL-6	PepproTech	900-K16	0117016
IL-12	PeprTech	900-TM96	0614T096-M
IL-15	RD	DY247	

4.13 Extração de RNA viral

O RNA viral foi extraído do sobrenadante da monocultura de monócitos infectados e da cocultura desses com as células NK, utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, (Qiagen, Alemanha) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante. Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 560 μ L de Tampão de Lise AVL+ 5,6 μ L de Carrier/AVE; 140 μ L do sobrenadante da cultura ou cocultura. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 560 μ L de álcool etílico PA à 100% e a suspensão foi homogeneizada. 630 μ L da mistura foram transferidos para uma coluna previamente numerada.

Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído do tubo coletor foi desprezado. Novo tubo coletor foi colocado na coluna e os 630 μ L restantes da mistura foram transferidos para a coluna. Depois da centrifugação por 1 minuto

a 8000 rpm, o eluído foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo coletor. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído foi descartado. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW2 e após centrifugação por 3 minuto a 14000 rpm o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml previamente identificado. Adicionou-se 60 µL de Tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna foi descartada e o RNA foi mantido e armazenado a - 70°C.

4.14 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti para a detecção do DENV durante as epidemias de 2016 e foi utilizado a metodologia de Johnson para a quantificação desse vírus nos sobrenadantes de cultura ou cocultura infectadas (JOHNSON *et al.*, 2005).

O protocolo para detecção do DENV consiste em uma transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) em microplaca óptica (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Johnson (*et al.* 2005). Neste procedimento, 5µl de RNA foi aplicado em 20 µl de uma mistura contendo H₂O livre de nucleases (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen™, California, EUA), além das sondas e primers específicos para este vírus.

A reação foi realizada em termociclador LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 45°C por 30 min); ativação da enzima (1 ciclo de 95°C por 10 min); desnaturação (45 ciclos de 95°C por 15 sec); anelamento/extensão (45 ciclo de 57°C por 1 min); extensão final (45 ciclo de 72°C por 1 min) e temperatura final (4°C).

A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do ZIKV, tanto durante a epidemia de 2016 quanto para a quantificação desse vírus nos sobrenadantes de cultura ou

cocultura infectadas, foi realizada em microplaca óptica (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti (*et al.*, 2008).

Neste procedimento, 5µl de RNA foi aplicado em 15 µl de uma mistura contendo H₂O livre de nucleases (Promega, Wisconsin, EUA), GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Wisconsin, EUA), além dos primers e sondas específicos para este vírus. A reação foi realizada em termociclador LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 45°C por 15 min); ativação (1 ciclo de 95°C por 2 min); desnaturação (45 ciclos de 95°C por 15 sec) e anelamento/extensão (45 ciclos de 60°C por 1 min).

4.15 Análise estatística

Todos os dados clínicos e laboratoriais foram tabulados num banco de dados no programa EXCEL. As diferenças das médias e ou medianas foram comparadas utilizando o teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney, em que $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Também foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de comparação de Dunn's, na comparação de três ou mais grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um software computacional chamado GraphPad Prism versão 8 (GraphPad, US).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização fenotípica de subpopulações de células NK no sangue periférico de pacientes mono e coinfectados pelo DENV e ZIKV

5.1.1 Análise da frequência das subpopulações de células NK circulantes em pacientes mono infectados pelo DENV ou ZIKV e coinfectados pelo DENV e ZIKV

Inicialmente, avaliamos as diferentes subpopulações das células NK durante a infecção natural pelo DENV e/ou ZIKV durante a fase aguda da doença. As PBMCs de pacientes foram descongeladas e analisadas através da citometria de fluxo após a marcação com anticorpos anti-CD56, CD16 e CD3. Foram analisados 5 grupos diferentes: doadores de sangue saudáveis (Controle); pacientes com outras doenças febris (ODF), pacientes mono infectados pelo DENV, pacientes mono infectados pelo ZIKV; e pacientes coinfectados pelo DENV e ZIKV (Figura 5.1).

A estratégia de gate para a análise das subpopulações das células NK em PBMCs de pacientes foi realizada conforme consta na Figura 5.1. Inicialmente, foram excluídos eventuais grumos, e posterior seleção da região morfológica de linfócitos. Em seguida, dentro do gate de linfócitos, foram excluídas as células CD3⁺ e as células NK foram estudadas por meio da expressão dos marcadores: CD56 e CD16.

Por esse método de análise, observamos duas subpopulações de células NK: CD56⁺ CD16^{neg} (CD56^{bright}) e CD56⁺ CD16⁺ (CD56^{dim}). Observamos um aumento significativo em ambas as subpopulações no grupo de pacientes com Dengue, em comparação a pacientes ODF. Além disso, foi observado um aumento na população de células CD56⁺ CD16⁺ do grupo de pacientes com Dengue em comparação com os doadores saudáveis. Além disso, observamos tendência de uma frequência maior de células NK CD56⁺ CD16⁺ (CD56^{dim}) nos pacientes coinfectados com DENV e ZIKV em comparação com doadores saudáveis.

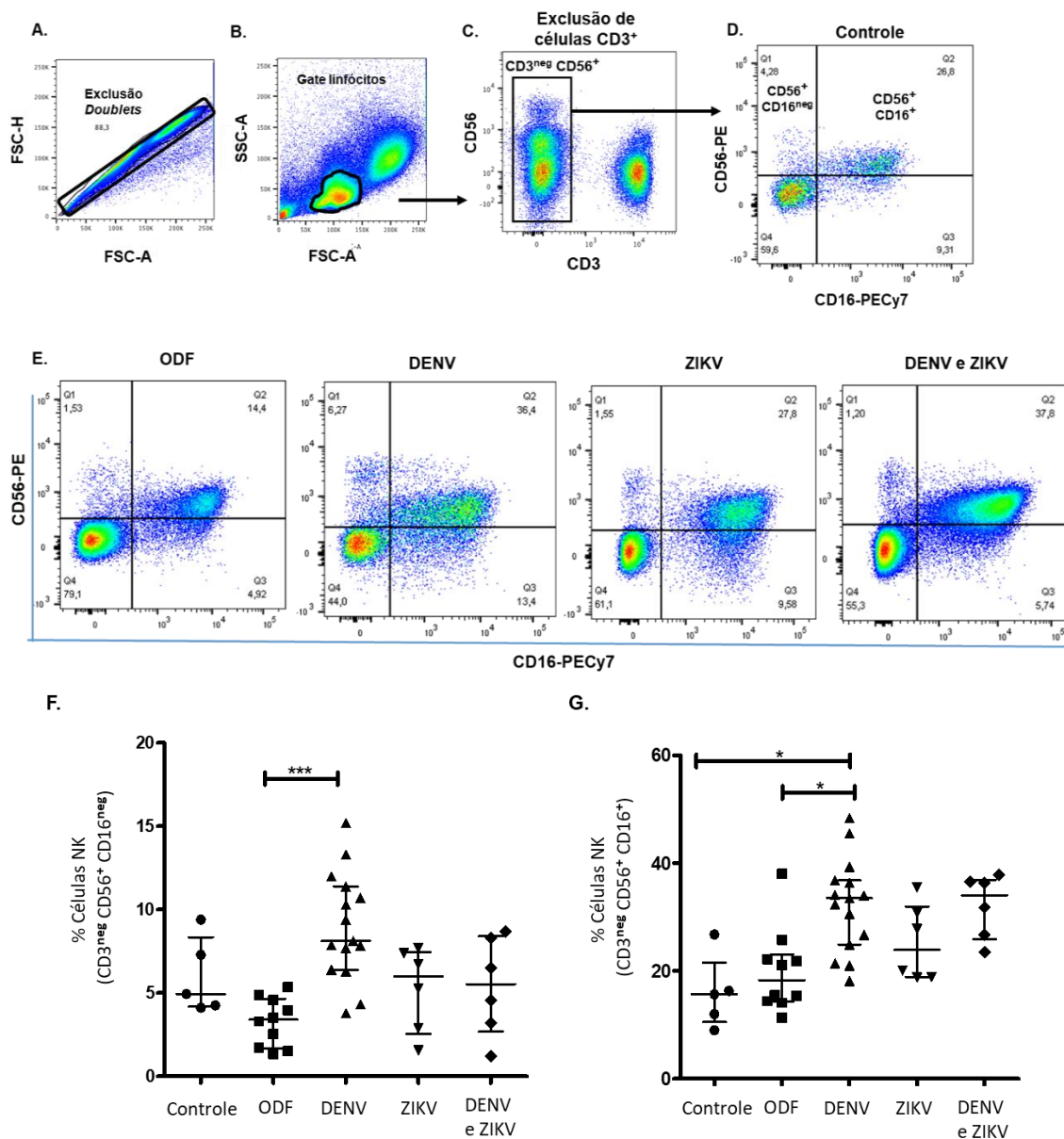


Figura 5.1: Frequência das subpopulações de células NK em pacientes com Dengue, Zika e coinfetados. As células NK foram analisadas a partir de PBMCs de pacientes coletadas na fase aguda e fenotipadas por meio da citometria de fluxo via imunomarcagem com anticorpos anti-CD3, anti-CD56 e anti-CD16. A estratégia para a seleção das subpopulações de células NK está representada na figura. **(A)** A estratégia de gate inicia-se com a exclusão de grumos, e em seguida, **(B)** a seleção da região morfológica de linfócitos. **(C)** Exclusão de células CD3 dentro do gate de linfócitos, selecionando a região de células NK CD3^{neg} CD56⁺. **(D)** Visualização das subpopulações de células NK em um indivíduo saudável (controle) por meio da imunofenotipagem com anticorpos monoclonais anti-CD56 e -CD16 na região CD3^{neg} CD56⁺. **(E)** Representação das frequências de células NK para os seguintes grupos: pacientes com outras doenças febris (ODF), Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e coinfetados com Dengue e Zika (DENV e ZIKV). **(F)** Frequência de células NK CD3^{neg} CD56⁺ CD16^{neg}. **(G)** Frequência de células NK CD3^{neg} CD56⁺ CD16⁺. As linhas representam as medianas com variação interquartil dos valores e cada ponto representa um doador. Valores foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn's.

5.1.2 Perfil de ativação das subpopulações de células NK circulantes em pacientes mono infectados pelo DENV ou ZIKV e co infectados pelo DENV e ZIKV

As células *Natural Killer* ativadas tornam-se citotóxicas e podem eliminar as células alvo por indução de apoptose. A exocitose de grânulos citotóxicos é um evento que leva a morte da célula alvo e possui duas proteínas essenciais dentro dos grânulos citotóxicos: perforina e granzima. A perforina forma poros na membrana plasmática das células alvo, permitindo a entrada de enzimas proteases pró-apoptóticas conhecidas como granzimas que levam à morte da célula alvo na presença ou ausência de ativação de caspases. Com o objetivo de estudar a atividade citotóxica das células NK, optamos por avaliar a expressão de perforina dentro de cada subpopulação das células NK nos diferentes grupos de pacientes.

A expressão de perforina tanto das células NK CD56^{bright} (Figura 5.2A) quanto CD56^{dim} (Figura 5.2B) foi analisada e observamos um aumento na porcentagem de células CD56^{dim} Perforina⁺ no grupo de pacientes mono infectados pelo DENV em comparação com pacientes ODF.

Além disso, observamos uma porcentagem maior de células NK CD56^{dim} Perforina⁺ (mediana 73; controle) quando comparado com as células NK CD56^{bright} Perforina⁺ (mediana 3.8; controle) em todos os grupos estudados.

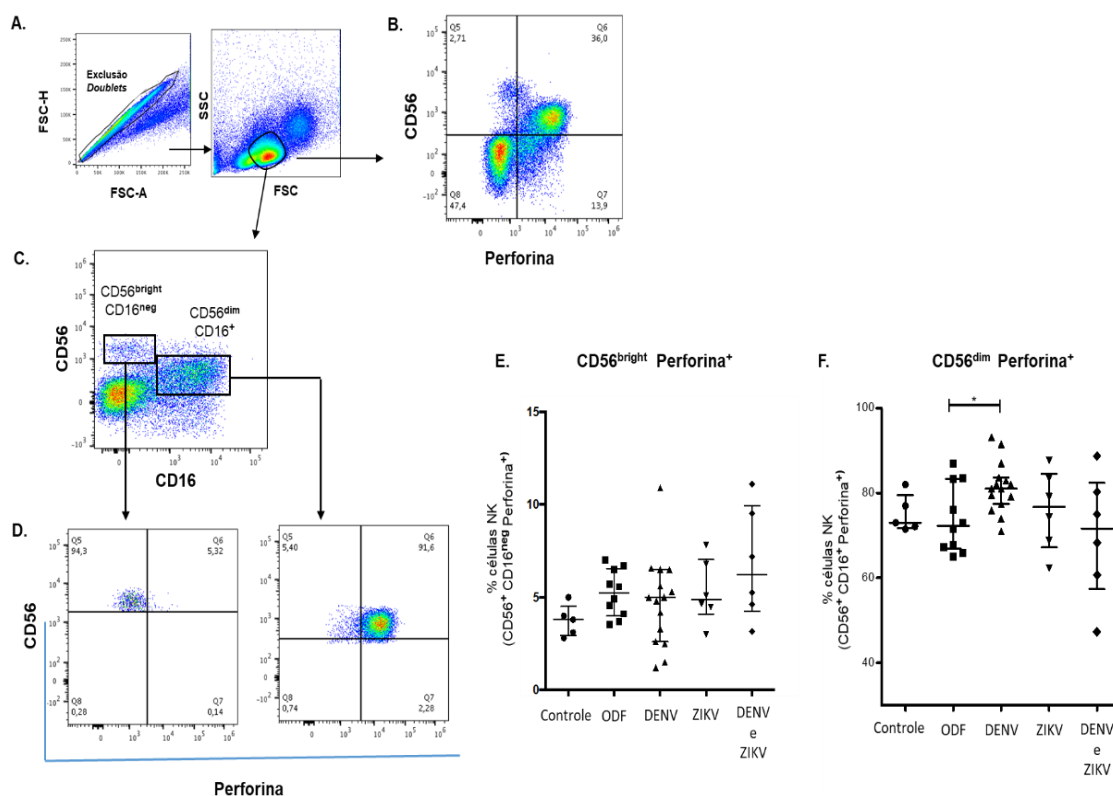


Figura 5.2: Frequência de células NK perforina positivas em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados. As células NK foram analisadas a partir de PBMCs de pacientes coletadas durante a fase aguda e posteriormente descongeladas e fenotipadas por meio da citometria de fluxo via imunomarcagem com anticorpos anti-CD56, anti-CD16, anti-CD3 e anti-perforina. A estratégia para a seleção das subpopulações de células NK está representado na figura. **(A)** A estratégia de gate inicia-se com a exclusão de grumos, e em seguida, a seleção da região morfológica de linfócitos. **(B)** Frequência das células NK totais por análise em citometria de fluxo via imunomarcagem de CD56 versus perforina, previamente selecionadas na região morfológica de linfócitos. **(C)** Visualização das subpopulações de células NK por meio da imunofenotipagem com anticorpos monoclonais anti-CD56 e -CD16 selecionadas previamente na região morfológica de linfócitos. **(D)** Frequência das duas subpopulações de células NK CD56^{bright} CD16^{neg} e CD56^{dim} CD16⁺ positivas para perforina. **(E)** Porcentagem de células NK CD56^{bright} CD16^{neg} Perforina⁺ e **(F)** Porcentagem de células NK CD56^{dim} CD16⁺ Perforina⁺ para os seguintes grupos: controles saudáveis, pacientes com outras doenças febris (ODF), Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e coinfectados com Dengue e Zika (DENV e ZIKV). As linhas representam as medianas com variação interquartil dos valores e cada ponto representa um doador. Todas as imagens são representativas de um paciente com Dengue. Os valores foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Avaliamos também a expressão de L-selectina, também conhecida como CD62L que é uma molécula de adesão celular encontrada em leucócitos. Sabe-se que a L-selectina atua como um receptor de retorno para linfócitos, induzindo-os a saírem da corrente sanguínea e entrarem em tecidos linfóides secundários.

Diminuindo assim, o transporte de linfócitos no sangue, como as células NK, e facilitando a entrada em um órgão linfóide secundário.

Neste sentido, analisamos a expressão de CD62L nas duas subpopulações de células NK (Figura 5.3) e não foi observado diferença estatística entre os grupos estudados. Os valores das medianas ficaram muito próximos entre os todos os grupos explorados.

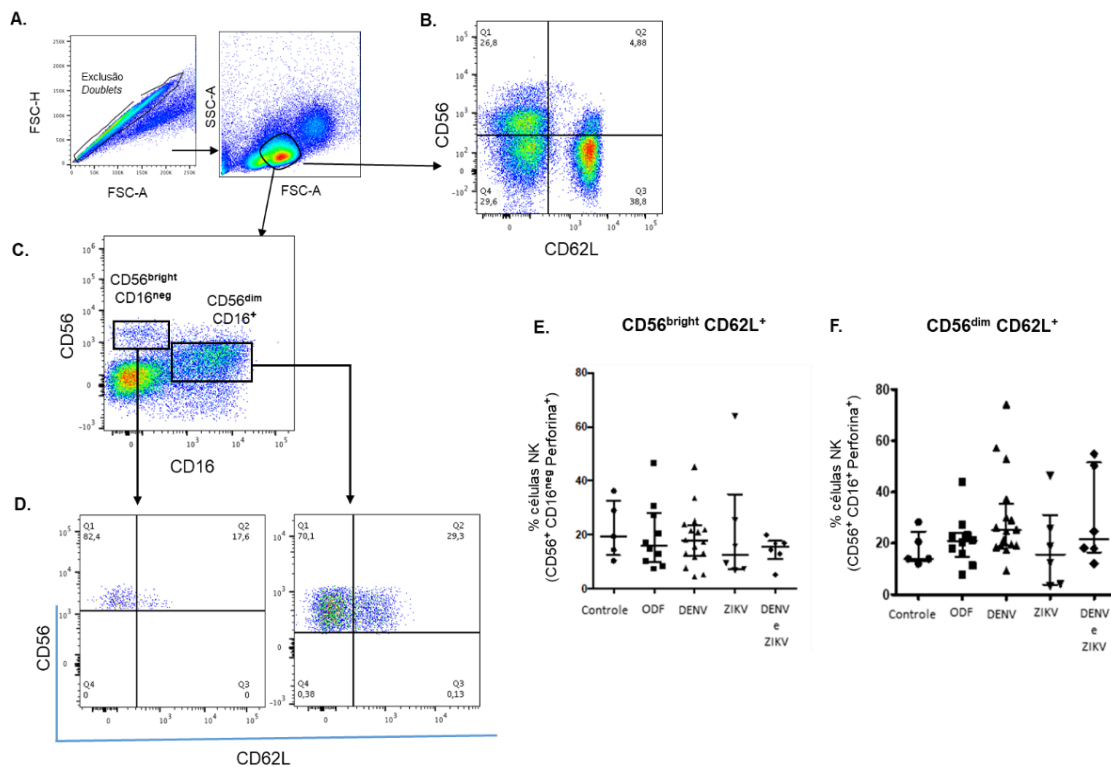


Figura 5.3: Frequência de células NK CD62L positivas em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados. As células NK foram analisadas a partir de PBMCs de pacientes coletadas na fase aguda e fenotipadas por meio da citometria de fluxo via imunomarcagem com anticorpos anti-CD56, anti-CD16, anti-CD3 e anti-CD62L. A estratégia para a seleção das subpopulações de células NK está representado na figura. **(A)** A estratégia de gate inicia-se com a exclusão de grumos, e em seguida, a seleção da região morfológica de linfócitos. **(B)** Frequência das células NK totais por análise em citometria de fluxo via imunomarcagem de CD56 versus CD62L, previamente selecionadas na região morfológica de linfócitos. **(C)** Visualização das subpopulações de células NK por meio da imunofenotipagem com anticorpos monoclonais anti-CD56 e -CD16 selecionadas previamente na região morfológica de linfócitos. **(D)** Frequência das duas subpopulações de células NK CD56^{bright} CD16^{neg} e CD56^{dim} CD16⁺ positivas para CD62L. **(E)** Porcentagem de células NK CD56^{bright} CD16^{neg} CD62L⁺ e **(F)** Porcentagem de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD62L⁺ para os seguintes grupos: controles saudáveis, pacientes com outras doenças febris (ODF), Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e coinfectados com Dengue e Zika (DENV e ZIKV). As linhas representam as medianas na variação interquartil dos valores e cada ponto representa um doador. Todas as imagens são representativas de um paciente com Dengue. Os valores foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Além da avaliação da expressão de perforina ou CD62L nas subpopulações de células NK, também analisamos a coexpressão de perforina e CD62L nestas células. Nossos resultados demonstraram frequência aumentada de células NK CD3^{neg} CD56^{dim} CD16⁺ coexpressando CD62L e perforina nos pacientes monoinfectados pelo DENV (mediana 23.7; n=15) quando comparados aos doadores saudáveis (mediana 11.8; n=5) e pacientes ODF (mediana 16.35; n=10) (Figura 5.4D). Além disso, o grupo de pacientes coinfectados pelo DENV e ZIKV (mediana 29.40; n=5) também apresentou aumento na frequência das células NK CD56^{dim} duplo positivas para perforina e CD62L, quando comparados com os indivíduos saudáveis (mediana 11.8; n=5). Não observamos diferença estatisticamente significativa ao analisarmos o subtipo (CD3^{neg} CD56^{bright} CD16^{neg}) quanto a coexpressão de CD62L e perforina entre os diferentes grupos analisados (Figura 5.4C).

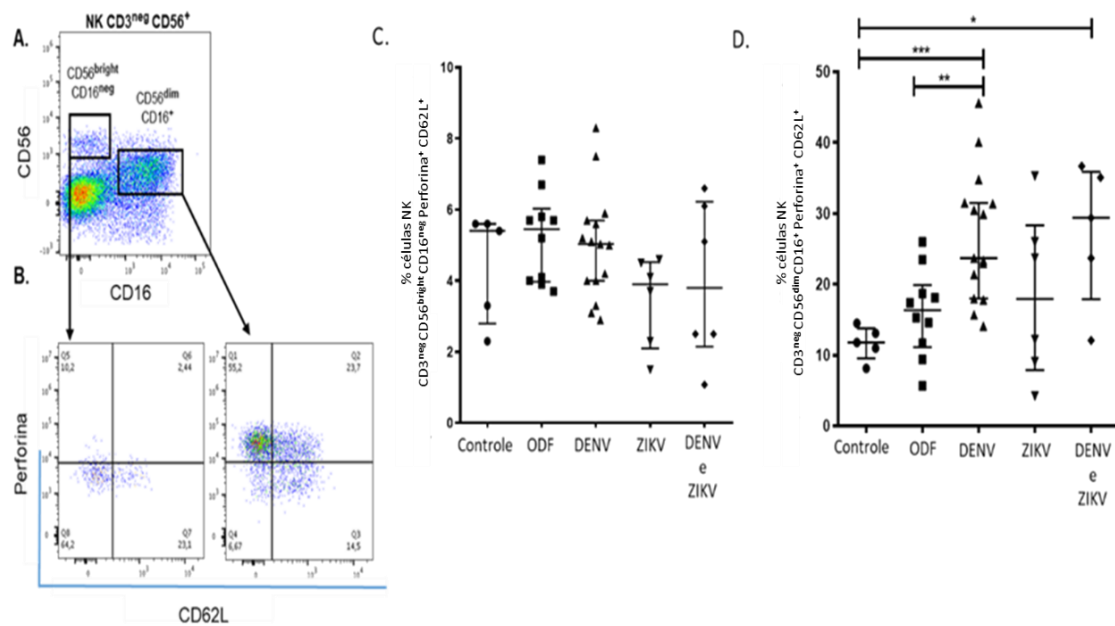


Figura 5.4: Perfil de ativação das subpopulações de células NK Perforina⁺ e CD62L⁺ em pacientes com Dengue, Zika e coinfectados. As células NK foram analisadas a partir de PBMCs de pacientes de fase aguda por meio da citometria de fluxo via imunomarcagem com anticorpos anti-CD3, anti-CD56, anti-CD16, anti-perforina e anti-CD62L. **(A)** Visualização das subpopulações de células NK por meio da imunofenotipagem com anticorpos monoclonais anti-CD56 e -CD16 selecionadas previamente na região morfológica de linfócitos. **(B)** Frequência das duas subpopulações de células NK CD56^{bright} CD16^{neg} e CD56^{dim} CD16⁺ duplo positivas para perforina e CD62L. **(C)** Porcentagem de células NK CD56^{bright} CD16^{neg} Perforina⁺ CD62L⁺. **(D)** Porcentagem de células NK CD56^{dim} CD16⁺ Perforina⁺ CD62L⁺ para os seguintes grupos: controles saudáveis, pacientes com outras doenças febris (ODF), Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e coinfectados com Dengue e Zika (DENV e ZIKV). As linhas representam as medianas com variação interquartil dos valores e cada ponto representa um doador. As imagens em (A) e (B) são representativas de um paciente com Dengue. Os valores foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Uma vez que observamos maior frequência das células NK, avaliamos também a frequência dos subtipos de linfócitos T CD3⁺ nos diferentes grupos de estudo. Na análise dos dados com a estratificação dos grupos, nós observamos uma diminuição na frequência de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ em pacientes com dengue comparados com os controles saudáveis : [**controles** 40 (39-52) n=6 vs. **DENV** 35 (21-49) teste Mann-Whitney p=0,0110) mediana com valores mínimos e máximos]; [**ODF** 45 (30-62 n=10); n=15; **ZIKV** 41 (27-51) n=6 ; **DENV e ZIKV** 26,8 (15-55) n=6].

Em relação aos linfócitos T CD3⁺ CD8⁺ não observamos diferença estatística na frequência destas células entre os grupos : [**controles** 25 (18-32) n=6; **ODF** 21 (13-25) n=10; **DENV** 25 (18-30) n=15; **ZIKV** 30 (6,4-44) n=6; **DENV**

e ZIKV 24 (9,8-31) n=6, mediana com valores mínimos e máximos]. No entanto, foi possível observar que pacientes infectados pelo DENV apresentaram diminuição na razão CD4/CD8 comparados com os pacientes ODF: [**ODF** 2,2 (1,3-4,1),n=10 vs. **DENV** 1,5 (0,7-2,6) n=15 teste Mann-Whitney p=0,008)]; [**controles** 1,8 (1,2-2,5) n=6; **ZIKV** 1,3 (0,7-4,4) n=6; **DENV e ZIKV** 1,4 (0,6-2,3) n=6, mediana com valores mínimos e máximos]. Estes resultados estão de acordo como dados prévios do nosso grupo em que se observa menor frequência de células T CD4 na fase aguda da infecção pelo DENV e maior frequência das células NK nas fases iniciais da infecção pelo DENV (AZEREDO *et al.*, 2006, GANDINI *et al.*, 2017).

5.1.4 Dosagem das citocinas circulantes em pacientes

Além da caracterização fenotípica e funcional das células NK por meio da citometria de fluxo, realizamos a dosagem de fatores solúveis relacionados com a ativação de células NK (IL-15, IL-12, IFN- α e IFN- γ), e fatores pró-inflamatórios (IL-6, e TNF- α) no soro de pacientes com Dengue ou Zika, coinfectados DENV e ZIKV e nos doadores saudáveis (Figura 5.5). O número de pacientes utilizados (n amostral) nesta quantificação de citocinas está de acordo com os dados representados na Tabela 4.1.

Ao analisarmos a dosagem das citocinas pró-inflamatórias, observamos que TNF- α apresentou níveis mais que duas vezes maiores no soro de pacientes monoinfectados pelo DENV (mediana 13.53 pg/mL; n=30) e coinfectados (mediana 14.55 pg/mL; n=11) em comparação ao controle (mediana 5.61 pg/mL; n=10) (Figura 5.5A). Em relação à dosagem de IFN- γ , foi observado que essa citocina apresentou níveis sete vezes maiores nos pacientes monoinfectados pelo DENV (mediana 30.90 pg/mL; n=11) em comparação com o controle (mediana 4.30 pg/mL; n=9) (Figura 5.5C).

Além disso, observamos que a citocina IL-6 apresentou níveis duas e quatro vezes maiores nos pacientes monoinfectados pelo DENV (mediana 842.5 pg/mL; n=29) e coinfectados pelo DENV e ZIKV (mediana 1382 pg/mL; n=10) respectivamente, quando comparados aos doadores saudáveis (mediana 317 pg/mL; n=9) (Figura 5.5D).

Ademais, verificamos que a citocina IL-15 apresentou níveis seis vezes maiores no soro de pacientes coinfetados pelo DENV e ZIKV (mediana 3.46 pg/mL; n=19) em comparação com grupo controle (mediana 0.5 pg/mL; n=10) (Figura 5.5F).

Em relação ao IFN- α (Figura 5.5B) e IL-12 (Figura 5.5E), não foi observado diferença significativa entre os grupos analisados. Assim como, também não encontramos significância em relação aos pacientes infectados pelo DENV apresentando DCSA e/ou Dengue grave, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes analisados. Interessantemente, podemos observar, por exemplo, que os pacientes DCSA apresentaram baixas dosagens de IFN- α e de IL-15.

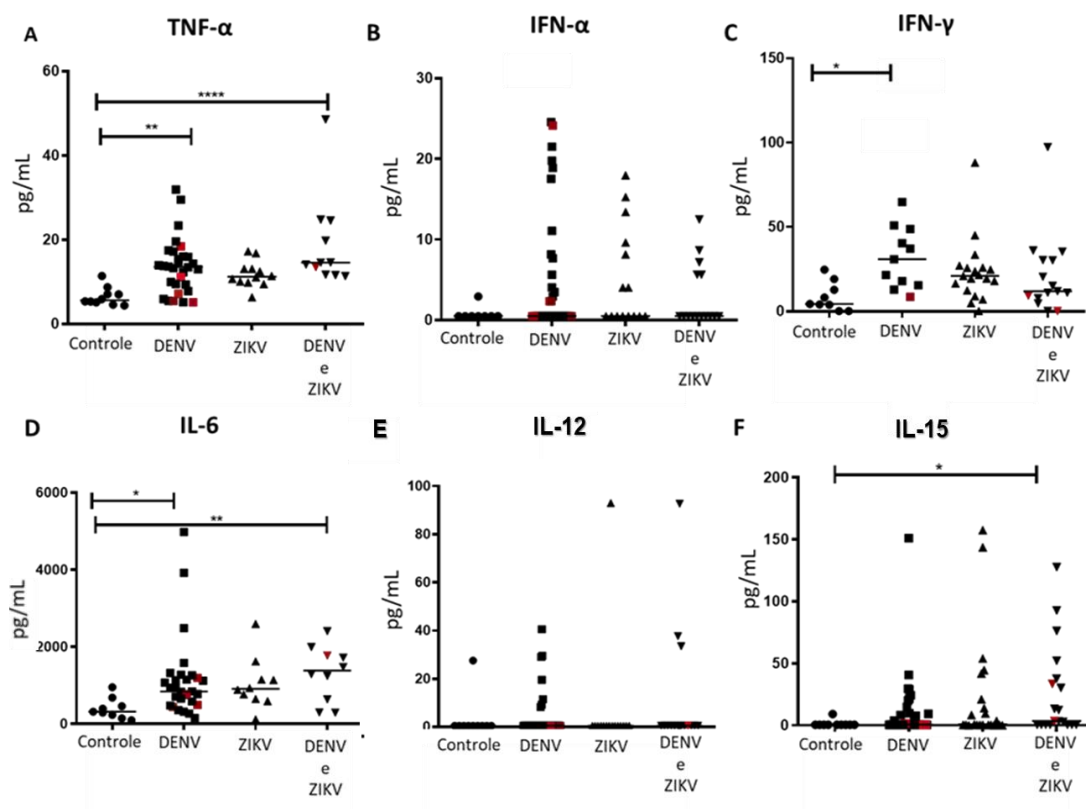


Figura 5.5: Citocinas circulantes em pacientes infectados pelo DENV ou ZIKV e coinfectados com DENV e ZIKV. Quantificação das citocinas (A) TNF- α , (B) IFN- α , (C) IFN- γ , (D) IL-6, (E) IL-12 e (F) IL-15, em controles (doadores de sangue saudáveis) e pacientes na fase aguda da doença. Na análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Linhas horizontais representam a mediana do grupo. *p < 0,01 **p < 0,001 ****p < 0,0001. Valores de p < 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

■▲ Representa pacientes com Dengue com Sinais de Alarme – DCSA e Dengue Grave

Sumarizando os resultados *in vivo* do estudo das células NK, observou-se em pacientes durante a fase aguda da infecção natural pelo DENV aumento significativo na frequência das células NK CD56^{bright} CD16^{neg} e CD56⁺ CD16⁺ em comparação com doadores saudáveis e ou pacientes ODF.

A expressão de perforina intracelular foi analisada e nossos dados indicam o aumento das células NK CD56^{dim} Perforina⁺ no grupo de pacientes mono infectados pelo DENV em comparação com pacientes ODF. Já em relação à expressão de CD62L, não foi possível detectar células NK CD62L⁺ em ambas as subpopulações. No entanto, ao avaliar a expressão de células *Natural Killer* CD3^{neg} CD56^{dim} CD16⁺ Perforina⁺ CD62L⁺, observamos aumento na porcentagem dessas células nos pacientes com Dengue e nos co infectados em comparação com o grupo controle. Ademais, pacientes mono infectados pelo DENV também apresentaram aumento dessa subpopulação duplo positiva para perforina e CD62L, em comparação com pacientes ODF.

A quantificação de citocinas circulantes revelou aumento significativo de TNF- α entre os grupos de pacientes mono infectados com DENV e co infectados em comparação com doadores saudáveis. Além disso, detectamos aumento nos níveis de IFN- γ nos pacientes com Dengue em relação aos doadores saudáveis. Observamos maiores níveis de IL-6 nos pacientes com Dengue e co infectados e de IL-15 nos co infectados quando comparados aos doadores saudáveis. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-12 e IFN- α entre os grupos estudados.

5.2 Caracterização funcional de células NK em modelo de cocultura de células NK com monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV

5.2.1 Padronização da cocultura de células NK e monócitos

Primeiramente, para avaliar a morte por citotoxicidade das células alvo infectadas pelas células NK, optamos por padronizar um modelo de cocultura com uma quantidade duas vezes maior de células NK do que a célula alvo infectada. Visto que os monócitos estão cada vez mais em evidência, sendo considerados os principais alvos da infecção pelo ZIKV (MICHLMAYR *et al.*, 2017), optamos por trabalhar com os monócitos como as células alvo da infecção pelo DENV e ZIKV *in vitro*. Para realizar a cocultura, foram utilizados apenas doadores saudáveis para a purificação das células.

Foi padronizada a purificação de células NK utilizando kits comerciais de separação magnética por seleção negativa. Primeiramente, observamos que as culturas de células NK sem IL-2 apresentam uma grande porcentagem de células mortas (dados não mostrados). Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a sobrevivência das células NK na cultura por 48h, e foi utilizado um marcador de viabilidade celular (Live and Dead), assim como, o marcador CD56 para análise das células NK viáveis após o isolamento (Figura 5.6). Observamos que apesar de 74% das células permanecerem vivas após 48h, a grande maioria (96,3%) expressou o marcador de células NK CD56.

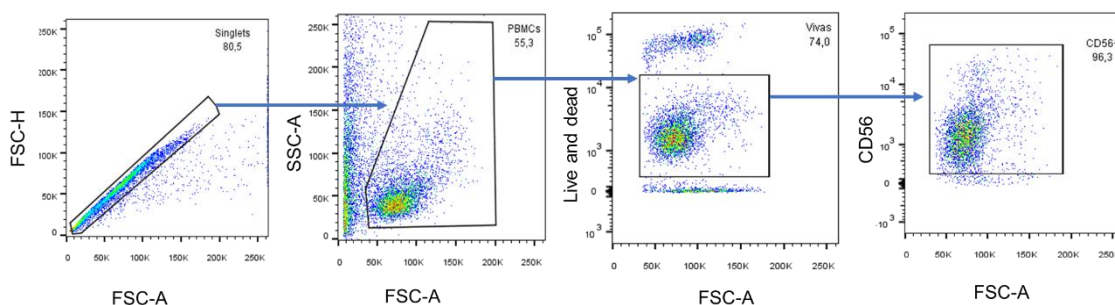


Figura 5.6: Purificação das células *Natural Killer*. A partir da obtenção de PBMCs de doadores saudáveis, as células NK foram purificadas e plaqueadas 2×10^5 células em uma placa de 96 poços e estimuladas com 50U de IL-2 por 48h. Depois de 48h, as células NK foram analisadas por meio da imunomarcação com CD56-PE para avaliar a purificação por citometria de fluxo.

Em seguida, investigamos a concentração ideal de IL-2 a ser utilizada nos ensaios de cocultura verificando a ativação das células NK através de marcadores de superfície para quantidades crescentes de IL-2 (Figura 5.7).

Células NK foram purificadas e cultivadas na presença de diferentes quantidades de IL-2 e incubadas por 48h. Foram testadas as seguintes concentrações: 1000 U/ml, 200 U/ml e 50 U/ml. Para avaliar a ativação das células NK com estímulo da IL-2, foram utilizados dois marcadores de ativação: NKp44 e CD69.

Foi observado um aumento tanto na expressão de NKp44 quanto CD69, após estímulo com IL-2 na subpopulação de células NK CD56^{bright} em comparação com a cultura de NK sem adição de IL-2 (Figura 5.7B). Também observamos aumento desses marcadores na subpopulação de células NK CD56^{dim}, em relação à cultura sem IL-2. Os valores de MFI (mediana da intensidade de fluorescência) para cada concentração de IL-2, assim como, na ausência de IL-2 estão representados na Figura 5.7.

Visto que a expressão de NKp44 e CD69 ficou bem próxima quando comparamos as culturas de células NK estimuladas com 50U e 1000U, optamos por utilizar 50U de IL-2 para ativação das células NK em cocultura com monócitos infectados.

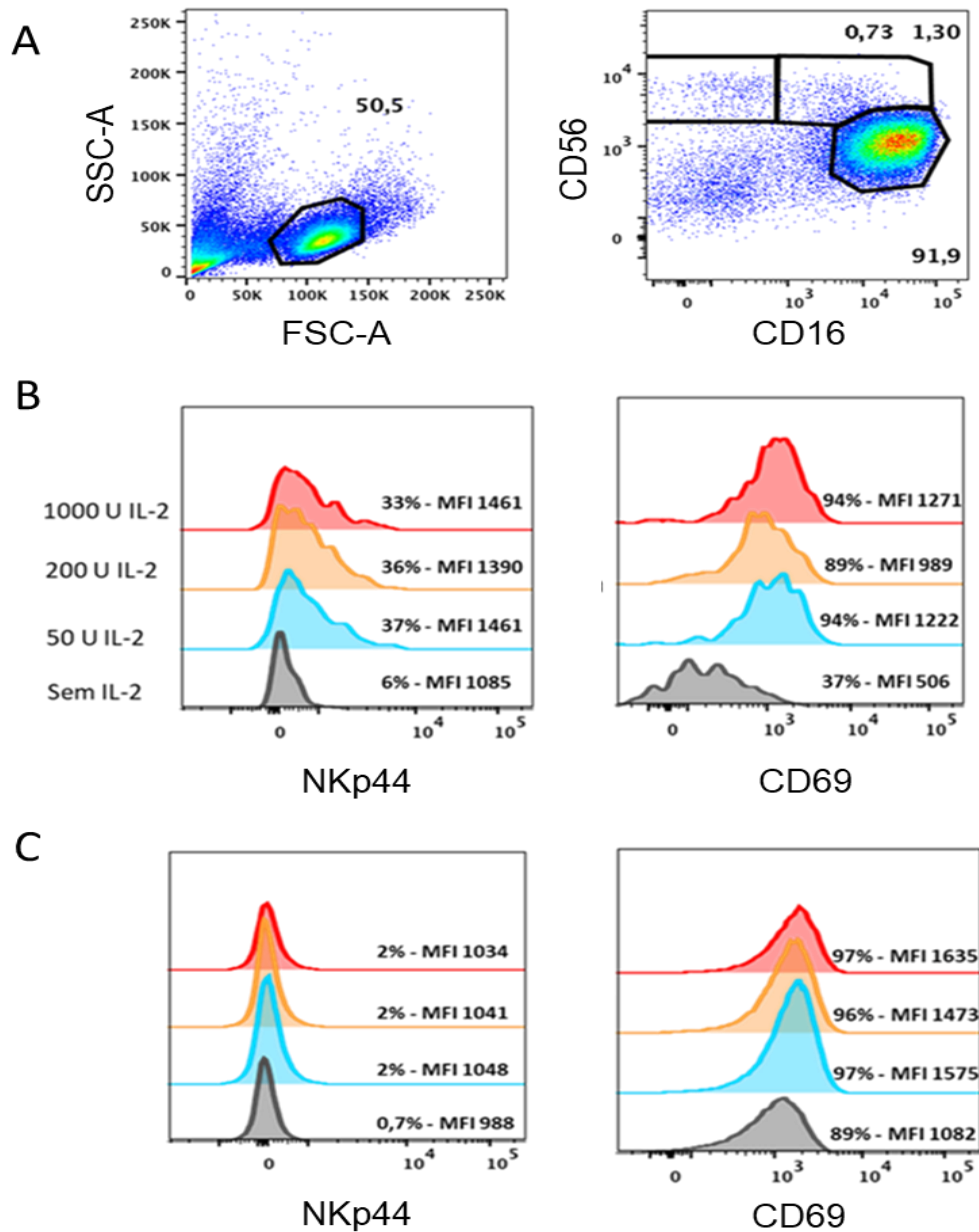


Figura 5.7: Padronização da concentração de IL-2 para ativação de células *Natural Killer*. PBMCs foram obtidas de buffy coat, e células NK foram isoladas utilizando kits comerciais de separação magnética por seleção negativa. Células NK foram cultivadas em meio RPMI e na presença de diferentes concentrações de IL-2 ou sem IL-2. Para avaliar a ativação das NKs, as células foram marcadas com NKp44 e CD69. (A) Representação da seleção de linfócitos e representação das células NK CD56^{bright} (0,73 + 1,30= 2,03%) e células NK CD56^{dim} (91,9%) dentro dos linfócitos selecionados em A. (B) Histograma representativo da marcação de NKp44 (painel à esquerda) e CD69 (painel à direita) na população de células NK CD56^{bright}. (C) Histograma representativo da marcação de NKp44 (painel à esquerda) e CD69 (painel à direita) na população de células NK CD56^{dim}.

Além da purificação das células NK, também foi padronizado o isolamento dos monócitos. Os monócitos foram analisados por meio da granulosidade (SSC-A) e tamanho (FSC-A) na citometria de fluxo, com auxílio de um marcador de viabilidade celular (Live and Dead) para análise das células viáveis após o isolamento e cultura dos monócitos (Figura 5.8). Observamos que esse modelo de cultura permitiu a obtenção de células viáveis (95,4% das PBMCs) e uma alta pureza da população monocítica (96,2%) mesmo após 48h de cultura.

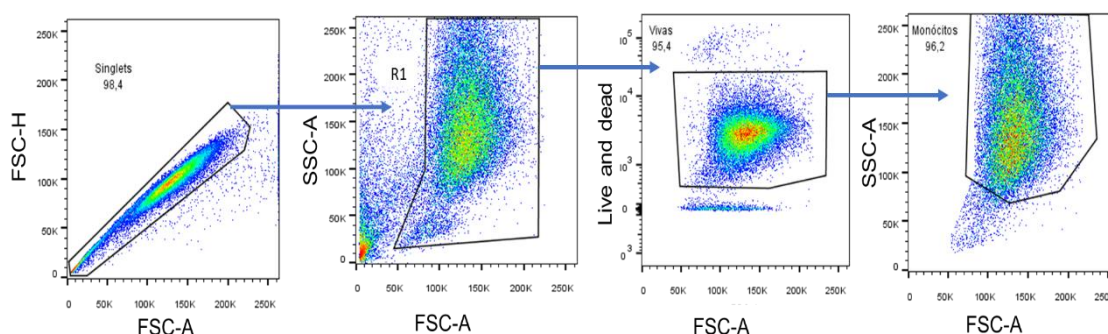


Figura 5.8: Purificação de monócitos. A partir da obtenção de PBMCs de doadores saudáveis, os monócitos foram purificados e plaqueados 2×10^5 em uma placa de 96 poços. Depois de 48h, os monócitos foram analisados por meio do tamanho e granulosidade.

5.2.2 Análise da frequência de células NK e monócitos em cocultura

Após toda a padronização da purificação e monocultura de células *Natural Killer* com a concentração ideal de IL-2, assim como o isolamento dos monócitos, nosso objetivo foi estudar a frequência de cada uma dessas células em cocultura em diferentes estímulos virais: DENV e ZIKV ultracentrifugados.

As células NK e os monócitos infectados foram cultivados em placas distintas, e a cocultura foi realizada 48h após a infecção durante 4 horas. Em seguida, as células foram marcadas para citometria de fluxo.

Primeiramente, observamos a frequência tanto das células NK quanto dos monócitos em cocultura após estimulação com DENV e ZIKV ultracentrifugados (Figura 5.9). A estratégia de seleção da região morfológica de monócitos e células NK é mostrada na Figura 5.9A, em que primeiramente é feito a exclusão de grumos e em seguida, foi selecionada a região morfológicamente de PBMCs

e posterior divisão de cada tipo celular (monócito e NK) por meio do tamanho e granulidade de ambos.

Vimos que há uma tendência de diminuição da população de monócitos, quando infectados com DENV ou ZIKV em comparação com os controles não estimulados (NS) e MOCK (Figura 5.9B). Já em relação às células *Natural Killer*, observou-se uma tendência de aumento na população quando cocultivados com monócitos infectados por DENV ou ZIKV em comparação com os controles não estimulados (NS) e MOCK.

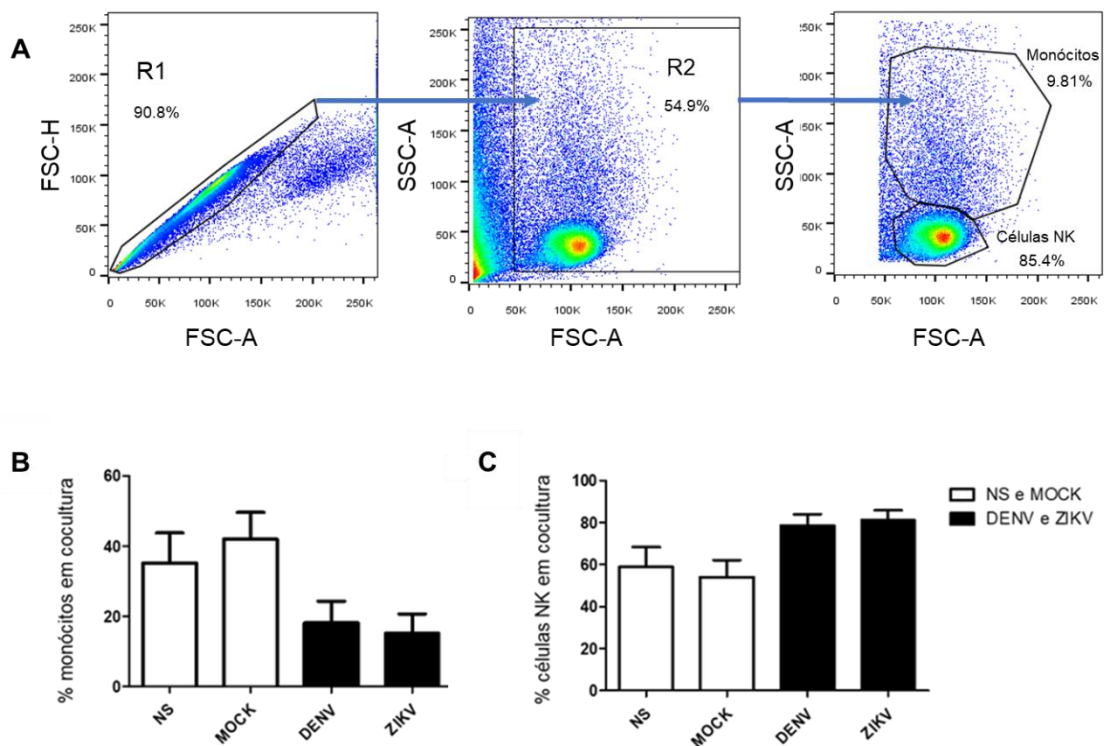


Figura 5.9: Porcentagem de monócitos e células *Natural Killer* em cocultura após estimulação pelo DENV-2 ou ZIKV ultracentrifugados. Os monócitos e as células NK foram purificados de PBMCs de doadores saudáveis e foram plaqueados 1×10^5 monócitos e 2×10^5 células NK em placa de 96 poços. Os monócitos foram estimulados com DENV, ZIKV, MOCK ou não estimulados. Após 48h da infecção, as células NK previamente cultivadas na presença de IL-2, foram cocultivadas com os monócitos infectados durante 4 horas. Tanto os monócitos quanto as células NK foram analisados por citometria de fluxo. **(A)** Imagem representativa de uma cocultura 48h após ser infectada com ZIKV, mostrando a estratégia de seleção da região morfológica de monócitos e células NK: inicialmente a exclusão de eventuais grumos (R1) e posterior seleção da região morfológica de PBMCs (R2) em que se incluem tanto os linfócitos quanto os monócitos, para posteriormente analisar a porcentagem de cada população em cocultura. **(B)** Porcentagem de monócitos em cocultura com células NK (n=2). **(C)** Porcentagem de células *Natural Killer* em cocultura com monócitos. NS (não estimulado). Experimento com dois doadores (n=2) realizado em duplicata.

5.2.3 Perfil de ativação das subpopulações de células NK em cocultura com monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV ultracentrifugados

Considerando a infecção de DENV e ZIKV nos monócitos, comprovada pela quantificação em reação em cadeia da polimerase (qPCR) (dados não mostrados: CT de DENV 24 e CT de ZIKV 28) , é possível que as células NK tornem-se células efetoras (citotóxicas ou produtoras de citocinas) em cocultura com esses monócitos infectados, e induzam a morte desses em cultura. Assim, com intuito de estudar a ativação das células NK, foi investigado a expressão de perforina e CD62L nas duas subpopulações de células NK (CD56⁺ CD16^{neg} e CD56^{dim} CD16⁺) nas coculturas de monócitos infectados pelo DENV ou ZIKV e células NK (Figura 5.10).

A estratégia de seleção de células NK utilizada nos experimentos *in vitro* foi idêntica àquela usada *ex vivo*: exclusão de grumos seguido da seleção da região morfológica de linfócitos e posterior divisão das subpopulações por meio da imunofenotipagem com CD56 e CD16 (Figura 5.10A).

Mesmo com apenas dois doadores saudáveis (n amostral), observamos a tendência de aumento na frequência de células CD56⁺ CD16^{neg} CD62L⁺ Perforina⁺ nas coculturas com monócitos infectados pelo DENV em comparação com coculturas não estimuladas (NS) (Figura 5.10B). Além disso, observa-se a propensão de aumento na frequência de células NK CD56⁺ CD16⁺ CD62L⁺ Perforina⁺ nas coculturas infectadas tanto pelo DENV quanto pelo ZIKV, em comparação com coculturas não estimuladas e MOCK.

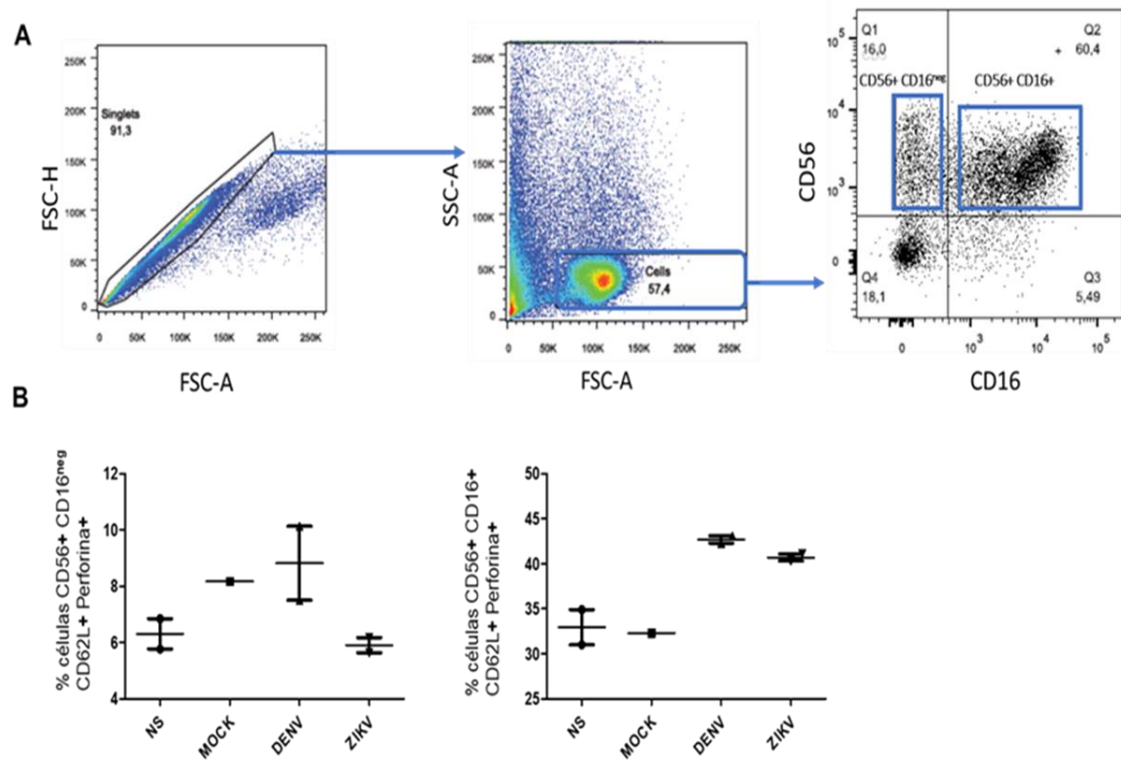


Figura 5.10: Dados preliminares da ativação das células *Natural Killer* CD62L e perforina positivas durante estimulação pelo DENV-2 ou ZIKV *in vitro*. Após a purificação de monócitos obtidos a partir de PBMC de doador saudável, monócitos foram infectados com DENV ou MOCK DENV. Após a adsorção viral, 48h depois da infecção foi realizada a cocultura por 4h. Duas diferentes subpopulações das células NK foram analisadas por citometria de fluxo após imunomarcagem para CD56, CD16, CD62L e perforina. **(A)** Estratégia de seleção das subpopulações de células NK CD56+ CD16- e CD56+ CD16+. **(B)** Porcentagem de células NK CD56+ CD16- CD62L+ Perforina+. **(C)** Porcentagem de células NK CD56+ CD16- CD62L+ Perforina+. Cada ponto representa um doador saudável feito em duplicata.

5.2.4 Avaliação da frequência de monócitos CD14⁺ CD16^{neg} e CD14⁺ CD16⁺ em cocultura após estímulo pelo DENV ou ZIKV ultracentrifugados

Em cultura, os monócitos apresentam-se como células mononucleares de formato arredondado e em suspensão (Figura 5.11). As imagens de microscopia de campo claro foram obtidas em monoculturas de monócitos 24h após plaquear diferentes quantidades de células: 1×10^5 (Figura 5.11A), 5×10^5 (Figura 5.11B) e 1×10^6 (Figura 5.11C). Considerando que aproximadamente após uma hora em cultura, os monócitos já começam a aderir à matriz, essas imagens representam monócitos já aderidos à matriz da placa de 24 poços com fundo chato. Esse experimento utilizando uma placa de 24 poços para o cultivo de monócitos purificados, foi importante para avaliar a morfologia dos mesmos e a possível contaminação com beads após a purificação.

A purificação de monócitos nos permitiu avaliar, além da frequência de monócitos em cocultura com células NK, a frequência de monócitos CD14⁺ CD16^{neg} e CD14⁺ CD16⁺ após estímulo pelo DENV ou ZIKV ultracentrifugados *in vitro* (Figura 5.12). Foram plaqueados 1×10^5 monócitos por poço em placa de 96 poços, e estimulados pelo DENV ou ZIKV por 150 minutos. Após esse período de adsorção viral, o sobrenadante foi descartado e o meio de cultura foi repostado. Depois de 48h de infecção, os monócitos foram analisados por citometria de fluxo por meio da imunofenotipagem com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16. Foi observado uma tendência de aumento na população de monócitos CD14⁺ CD16⁺ estimulados pelo DENV ou ZIKV em comparação com a cultura de monócitos não estimulados.

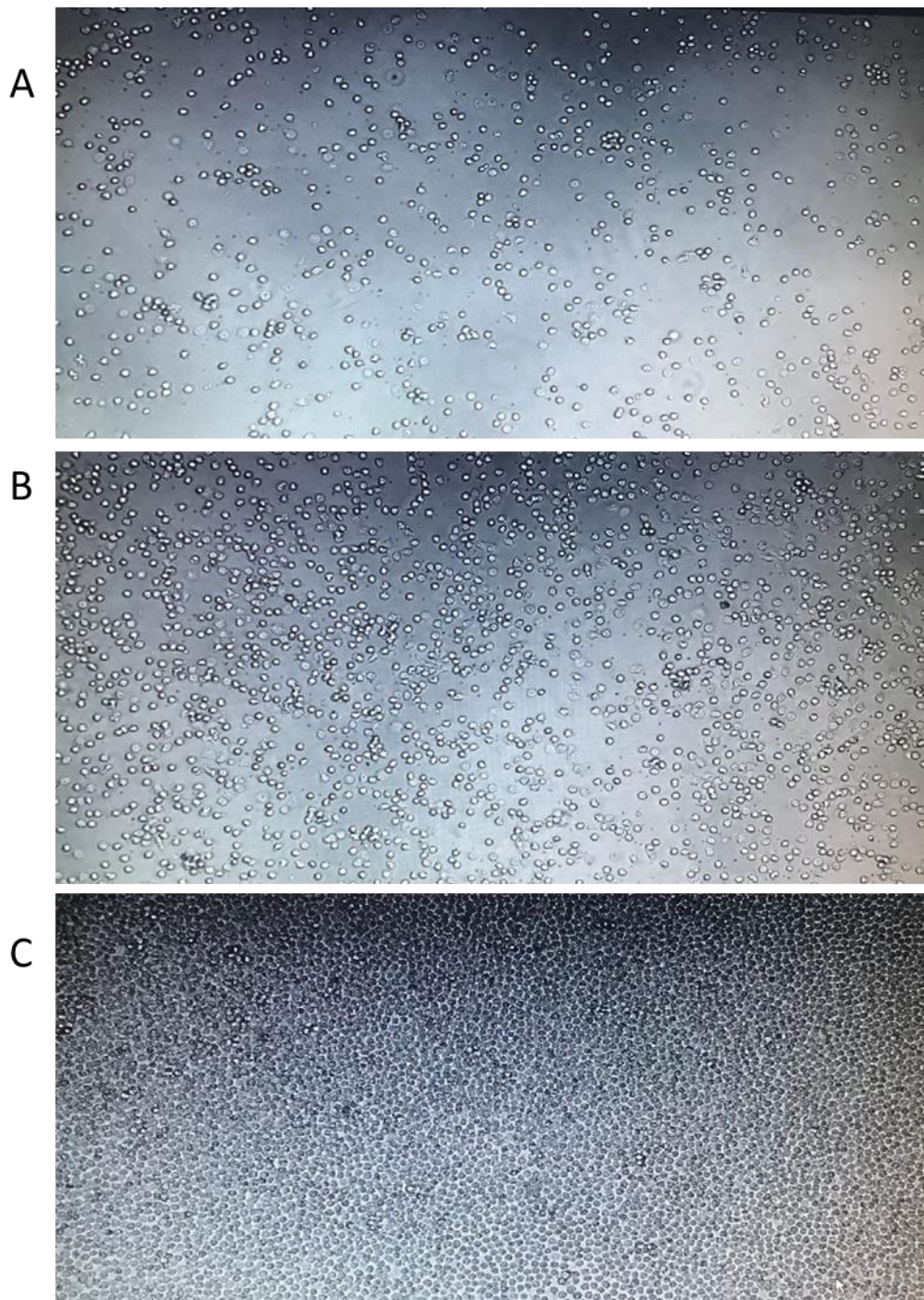


Figura 5.11: Microscopia de campo claro de monócitos. Após a purificação de monócitos com PBMC de doadores saudáveis, os monócitos foram plaqueados em monocultura em diferentes quantidades em placa de 24 poços. **(A)** 1×10^5 monócitos por poço. **(B)** 5×10^5 monócitos por poço. **(C)** 1×10^6 monócitos por poço.

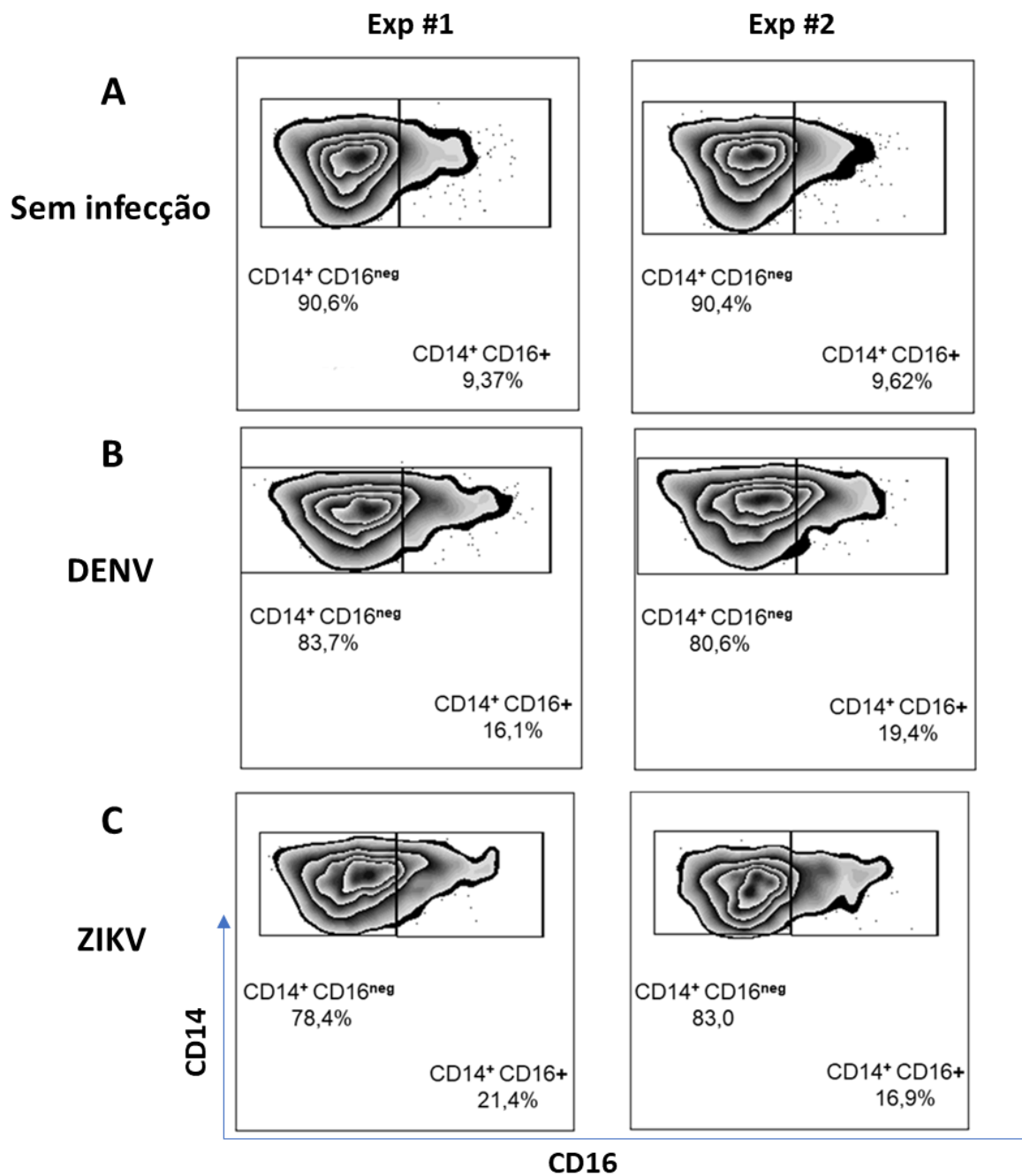


Figura 5.12: Frequência de monócitos CD14⁺ CD16^{neg} e CD14⁺ CD16⁺ em cocultura após estímulo com DENV ou ZIKV *in vitro*. Os monócitos foram purificados de PBMCs de doadores saudáveis e foram plaqueados 1×10^5 monócitos em placa de 96 poços. Os monócitos foram estimulados com DENV, ZIKV ou não estimulados. Após 48h da infecção, os monócitos foram analisados por citometria de fluxo por meio da imunofenotipagem com anticorpos anti-CD14 e anti-CD16. Cada letra representa duas imagens em duplicata do experimento.

6 DISCUSSÃO

As células *Natural Killer* compreendem aproximadamente 10% de todos os linfócitos circulantes e são caracterizadas fenotipicamente por meio da expressão dos antígenos CD56 e CD16 na superfície da célula NK, além da ausência de CD3. Essas células são classificadas em diferentes subpopulações de acordo com a expressão desses marcadores (CD56 e CD16) diferenciando a habilidade desses subtipos em atuar tanto na morte de células alvo, quanto na produção de citocinas imunoregulatórias que vão modular a resposta imunológica recrutando outras populações de células do sistema imune (COOPER *et al* 2001).

As funções efectoras das células NK são fundamentais na imunidade antiviral, porque eliminam as células infectadas, colaborando para a redução da carga viral e assim, podendo impactar a favor de um prognóstico positivo para um paciente com uma infecção viral, como Dengue ou Zika.

O processo de ativação das células NK pode variar de acordo com as subpopulações analisadas. As células NK CD56⁺ CD16⁻ possuem um perfil mais imunoregulador porque são rápidas produtoras de citocinas que podem influenciar nas respostas de outras populações celulares. Já as células NK CD56⁺ CD16⁺ possuem um perfil mais citotóxico, já que expressam grânulos citolíticos como as perforinas e granzimas, além de expressarem mais CD16 que é capaz de induzir ADCC (ROMAGNANI *et al.*, 2007).

Nosso objetivo inicial neste trabalho foi estudar o fenótipo das células NK durante a infecção natural pelos vírus Dengue e Zika em pacientes sintomáticos na fase aguda de monoinfecção por DENV ou ZIKV, e coinfectados DENV e ZIKV. Optamos por analisar o fenótipo das subpopulações CD3^{neg} CD56⁺ CD16^{neg}, com perfil imunoregulatório, e a população CD3^{neg} CD56⁺ CD16⁺, com função efectora citotóxica, em cada um dos grupos monoinfectados para DENV ou ZIKV e coinfectados com ambos os vírus, além do controle saudável representado por doadores de sangue saudáveis e pacientes com outras doenças febris (diagnóstico negativo para DENV e/ou ZIKV e negativo para alfavírus como CHIKV).

As PBMCs dos pacientes monoinfectados pelo DENV ou ZIKV, e coinfectados foram analisadas por citometria de fluxo. Os nossos dados

demonstraram elevada frequência de células NK circulantes em pacientes mono infectados pelo DENV quando comparados com indivíduos saudáveis e pacientes ODF. Esses resultados corroboram com dados prévios da literatura e sugerem que as células NK desempenham um papel na resposta imune inata anti-DENV, principalmente por meio da limitação da replicação do vírus nos estágios iniciais de infecção (GREEN *et al.*, 1999b; AZEREDO *et al.*, 2006; GANDINI *et al.*, 2017).

Também foi avaliado a frequência das diferentes subpopulações de células NK, na qual observamos o aumento de ambas as subpopulações de células NK estudadas neste trabalho (CD56⁺ CD16^{neg} e CD56⁺ CD16⁺) nos pacientes infectados pelo DENV.

Diversos estudos já mostraram um número maior de células NK em pacientes com Dengue branda (Febre do Dengue - FD) em comparação com crianças que desenvolveram FHD (Febre Hemorrágica do Dengue - FHD) (HOMCHAMPA *et al.*, 1988; GREEN *et al.*, 1999b; WAHID *et al.*, 2000). Além disso, Green e col. (1999) descreveram maior frequência de células CD56⁺CD16⁺ em crianças com quadros de FD em relação a FHD (GREEN *et al.*, 1999b). Isso mostra que a infecção pelo DENV possui impacto nos números das células NK totais na fase aguda da doença.

Corroborando com os dados do presente trabalho, Azeredo e col. (2006) demonstraram aumento significativo na frequência de células NK circulantes (CD3^{neg} CD56⁺) em pacientes durante a fase aguda da Dengue (AZEREDO *et al.*, 2006). Além disso, os autores mostraram que a frequência de células NK em pacientes com Dengue branda é maior do que nos controles saudáveis e nos pacientes graves (AZEREDO *et al.*, 2006).

De uma forma geral, estudos envolvendo adultos mostraram que pacientes com um quadro de Dengue brando possuem maior quantidade de células NK, sendo a maioria das células com expressão elevada de marcadores de ativação, como CD69, CD38 e HLA-DR, em comparação com pacientes com Dengue grave que mostrou menor quantidade de células *Natural Killer* (AZEREDO *et al.*, 2006). Assim, sugere-se que o aumento do número dessas células e de marcadores de ativação podem indicar um bom prognóstico da doença.

Até o presente momento, existem poucos estudos na literatura utilizando abordagens que envolvam a imunidade inata e células NK. Um estudo recente mostrou que o vírus Zika é capaz de escapar da detecção das células NK aumentando a expressão de moléculas MHC classe I (GLASNER *et al.*, 2017). Glasner e colaboradores mostraram ainda que as células do epitélio da retina ARPE-19 infectadas com ZIKV regularam a expressão de moléculas de MHC de classe I por meio da indução de IFN tipo I, com aumento nos níveis de RNA mensageiro de IFN- β , mas não de IFN- α . Além disso, após a infecção pelo ZIKV *in vitro*, as células infectadas produziram grandes quantidades de IFN- γ , e foram protegidas da morte pelas células NK, sugerindo que o ZIKV explora a resposta do IFN tipo I e II para regular positivamente as proteínas do MHC de classe I e assim escapar das respostas induzidas pelas NKs (GLASNER *et al.*, 2017).

Além do ZIKV, o DENV também é capaz de aumentar a expressão de moléculas MHC classe I (YOSSEF *et al.*, 2012). Alguns autores sugerem que a regulação positiva do MHC classe I ocorre como consequência da montagem dos flavivírus, e não como um mecanismo evoluído para promover o escape imune (LOGIBS *et al.*, 2004). Assim, esse aumento de moléculas MHC classe I promove o escape viral da detecção das células NK, no entanto, essa regulação vem com um custo importante para o vírus: o aumento do potencial reconhecimento de células infectadas por CTLs restritos à classe I do MHC (MULLBACHER & LOGIBS *et al.*, 1995; DOUGLAS, 1994).

No entanto, a generalidade do aumento de MHC classe I pelos flavivirus sugere que este pode ser um atributo evolutivo importante para esses vírus (HERSHKOVITZ *et al.* 2008). Uma hipótese a esse respeito é que a regulação do MHC de classe I facilita o direcionamento viral para o sistema imune adaptativo, resultando na geração de células T de baixa afinidade que são ineficazes em controlar a propagação viral (YOSSEF *et al.*, 2012).

Em seguida, investigamos a frequência dessas subpopulações de células NK positivas para perforina. Nossos dados mostraram o aumento de células NK CD56^{dim} no grupo de pacientes com Dengue em comparação com ODF.

Além disso, visto que as células NK citotóxicas são as CD56^{dim}, observamos maior porcentagem de células NK CD56^{dim} Perforina⁺ quando

comparado com as células NK CD56^{bright} Perforina⁺ que possui função efetora associada à imunoregulação.

As perforinas são proteínas que formam poros na membrana das células-alvo que podem perturbar a permeabilidade e levar a lise osmótica. Ao mesmo tempo que ajuda a permitir a apoptose mediada por granzimas. Alguns estudos mostraram que a expressão de perforina pode ser usada como um importante biomarcador de prognóstico. Nos casos de câncer de pulmão em estágio avançado, maior número de CTLs que expressam perforina foi positivamente associado ao aumento da sobrevida (XU *et al.*, 2015).

No entanto, outros estudos mostraram que a menor sobrevida dos pacientes com linfoma não-Hodgkin está claramente relacionada à diminuição da expressão gênica de perforina e granzima B, demonstrando que a resposta imune prejudicada desses indivíduos foi responsável pela pior evolução da doença (SOUZA *et al.*, 2017). Além disso, as células NK tiveram uma expressão mais baixa de perforina quando comparadas com CTLs (SOUZA *et al.*, 2017).

Na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foi demonstrada uma correlação negativa na expressão de células T CD8⁺ positivas para perforina e a contagem de células T CD4⁺ no sangue periférico (HEINTEL *et al.*, 2002).

Outros estudos mostraram que a expressão de perforina em linfócitos T CD8⁺ foi regulada negativamente em pacientes com tuberculose pulmonar ativa (JIANG *et al.*, 2017). Ademais, um trabalho mostrou que houve diminuição estatística na frequência de linfócitos T, células NK e NKT, assim como na expressão de perforina nos pacientes com lesão simultânea de membros inferiores e torácica em comparação com grupo de doadores saudáveis (GRZALJA *et al.*, 2017). Além disso, foi sugerido que a diminuição da frequência e do potencial citotóxico dos linfócitos do sangue periférico estaria relacionada à gravidade da lesão traumática, o que pode explicar o mecanismo subjacente que contribui para a ocorrência de complicações (GRZALJA *et al.*, 2017).

Estudos em camundongos knockout para perforina (camundongos que não expressam perforina) mostraram que a perda da funcionalidade da perforina está associado com a desregulação imunológica e citotoxicidade prejudicada, demonstrando o papel crucial da perforina no sistema imunológico. (BOLITHO

et al., 2007). Além disso, esses estudos suportam o papel-chave da perforina em permitir a entrada de granzimas para induzir a apoptose (VOSKOBOINIK *et al.*, 2006; BOLITHO *et al.*, 2007).

Embora não tenha sido encontrada diferença estatística em relação aos pacientes infectados pelo ZIKV ou coinfectados em comparação com controle e ODF, isso pode ser em virtude do teste estatístico que foi utilizado ou devido ao pequeno número amostral. Apesar disso, no neste presente estudo parece que a infecção pelo ZIKV não induziu muito a resposta das células NK, o que é corroborado com o trabalho *in vitro* de Glasner e colaboradores em 2017 (GLASNER *et al.*, 2017). No entanto, outro estudo *in vitro* mostrou ativação das células NK após a infecção pelo ZIKV em PBMCs (LUM *et al.*, 2018).

É fundamental que tenham mais estudos investigando a resposta imune inata na infecção pelo ZIKV, com número maior de amostras, já que até o presente momento só há dois trabalhos com células NK e ZIKV (GLASNER *et al.*, 2017; LUM *et al.*, 2018). Neste presente estudo, observamos baixa atividade das células NK em resposta à infecção natural pelo ZIKV, assim como *in vitro*, com a cocultura de monócitos infectados e células NK.

Há evidências que as células NK podem ser recrutadas ativamente para os sítios de infecção viral em tecidos periféricos. (MCINTYRE & WELSH, 1986; BIRON *et al.*, 1983; NATUK & WELSH, 1987). O tráfego de leucócitos do sangue periférico para os tecidos e órgãos é fundamental nas respostas inflamatórias e é rigidamente regulado por várias moléculas de adesão celular em várias etapas (BUTCHER *et al.*, 1996; SPRINGER, 1995).

Com o intuito de estudar a ativação e tráfego das células NK *in vivo* e *in vitro*, avaliamos a influência de CD62L, membro das selectinas que é importante para que as células NK se direcionem e migrem para os nódulos linfáticos, marcador importante para maturação das células NK e além de estar associado com suas funções efetoras (JUELKE *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstraram frequência aumentada de células NK CD3^{neg} CD56^{dim} CD16⁺ coexpressando CD62L e perforina nos pacientes monoinfectados pelo DENV quando comparados aos doadores saudáveis e pacientes ODF. Além disso, o grupo de pacientes coinfectados pelo DENV e ZIKV também apresentou aumento na frequência das células NK CD56^{dim} duplo

positivas para perforina e CD62L, quando comparados com os indivíduos saudáveis

Nossos dados *in vivo* demonstraram frequência aumentada de células NK CD3^{neg} CD56^{dim} CD16⁺ coexpressando CD62L e perforina nos pacientes mono infectados pelo DENV quando comparados aos doadores saudáveis e pacientes ODF. Além disso, o grupo de pacientes co infectados pelo DENV e ZIKV também apresentou aumento da porcentagem de células NK CD56^{dim} duplo positivas para perforina e CD62L, quando comparados com os indivíduos saudáveis.

De fato, grande parte dos pacientes analisados foram classificados como DSSA e poucos como DCSA/grave. Ainda é importante avaliarmos a resposta das células NK durante a infecção pelo DENV especialmente nos casos mais graves. É importante ressaltar que a ativação e elevada frequência de células NK verificadas no grupo de pacientes infectados pelo DENV, representa majoritariamente o sorotipo DENV-1 (36/40 – 90%). Não sabemos quais seriam os desfechos se tivéssemos por exemplo o sorotipo DENV-2, que é frequentemente associado com casos mais graves.

Uma vez que as citocinas regulam e recrutam células efetoras do sistema imunológico, além de ativar as células NK, avaliamos os níveis de citocinas circulantes presentes no soro de pacientes naturalmente infectados pelo DENV ou ZIKV e co infectados. Neste estudo, foi possível dosar citocinas ativadoras das células NK, como IFN- α , IL-12 e IL-15, assim como citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IFN- γ . De maneira geral, observamos o aumento nos níveis de TNF- α no soro de pacientes mono infectados pelo DENV e co infectados em comparação com doadores saudáveis. O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina multifuncional que tem efeitos importantes na inflamação e é conhecido por ser um dos mais potentes ativadores do endotélio microvascular e consequentemente, indutor do aumento da permeabilidade capilar, estando associado a tempestade de citocinas e à Síndrome do Choque da Dengue (WATI *et al.*, 2011). Existem inúmeros trabalhos que demonstram níveis elevados de TNF- α e IL-6 durante a infecção pelo DENV, corroborando com nossos dados, no entanto existem poucos estudos com pacientes infectados pelo ZIKV, e menos ainda com co infectados pelo DENV e ZIKV. Consolidando os nossos

resultados, um trabalho recente mostrou aumento nos níveis de TNF- α e IFN- γ em pacientes com Dengue em comparação com doadores saudáveis (PATRO *et al.*, 2019).

Já foi mostrado que a indução *in vitro* de IFN- α , mas não IFN- γ , é eliminada em células infectadas pelo ZIKV (KUMAR, *et al.*, 2016), sugerindo que o ZIKV é eficiente no bloqueio de IFN- α . Ao mesmo tempo que induz uma baixa produção de IFN- γ e produz quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-9 (CHAUDHARY *et al.*, 2017).

A ausência de indução da produção de IFN I/III sugere a habilidade do ZIKV de evadir da detecção das células imunes não apenas inibindo a resposta antiviral do IFN do tipo I, mas também afetando na produção do mesmo (CHAUDHARY *et al.*, 2017). Sabe-se que IFN tipo I representa uma resposta de defesa inicial e essencial contra vírus. Já foi relatado que o DENV desencadeia uma resposta robusta do IFN tipo I; no entanto, o perfil de IFN- α/β na progressão da doença não está bem caracterizado (TALARICO *et al.*, 2017).

Gandini e colaboradores mostraram que o DENV-2 ativou células dendríticas plasmocitóides (pDCs) *in vitro* que produziu mais de mil vezes mais IFN- α do que outros tipos celulares em resposta à exposição pelo DENV (GANDINI *et al.*, 2013). As pDCs poderiam assim, diminuir a infecção de monócitos pelo DENV, estimulando a ativação das células NK e atuando assim, na imunopatogênese da Dengue controlando a infecção viral.

Importante ressaltar que até o presente momento existe apenas um estudo que analisou os níveis IFN- α em pacientes infectados pelo ZIKV (KAM *et al.*, 2017) e nenhum estudo com pacientes coinfectados. Nossos resultados mostram que a maioria dos pacientes infectados pelo ZIKV apresentaram baixas dosagens de IFN- α , corroborando com os dados da literatura descritos acima a respeito da evasão do ZIKV.

Recentemente foi mostrado que a infecção natural pelo ZIKV em pacientes, induziu a redução de IFN- γ produzido por células T CD4 (CIMINI *et al.*, 2017). No entanto, já é bem estabelecido a importância do sistema IFN tipo II no contexto da infecção pelo DENV (BOZZA *et al.*, 2008), sendo associado com a gravidade em pacientes infectados pelo DENV-3 (BOZZA *et al.*, 2008) e

associado com o *clearance* viral durante a fase aguda da Dengue (GUNTHER *et al.*, 2011).

Além disso, foi visto em camundongos deficientes para IFN- γ que na ausência de IFN- γ , ocorre a replicação pelo DENV de forma intensa e incontrolável, o que leva a manifestação grave da doença, e possível letalidade em tempos iniciais de infecção (COSTA *et al.*, 2012).

Já foi visto um aumento na expressão de citocinas como IL-6, IL-12, IL-8, CCL5 e CX-CL10 na infecção pelo ZIKV em astrócitos humanos *in vitro* (STEFANIK *et al.*, 2018).

Observamos o aumento nos níveis tanto de IL-6 quanto de IL-15 em pacientes coinfectados. A IL-15 é uma citocina com estrutura e função similar à IL-2, sendo assim, é essencial para o desenvolvimento, expansão e sobrevivência das células NK e células T. Além disso, a IL-15 aumenta a citotoxicidade das células NK, assim como a produção de citocinas IFN- γ , GM-CSF e TNF- α (FEHNIGER & CALIGIURI, 2001).

Em relação à infecção natural pelo DENV, já foram encontrados níveis elevados de IL-15 em pacientes com sinais de alarme, além de ser uma citocina conhecida por estar envolvida na ativação e proliferação das células T e demonstrou ser necessária para a divisão das células T CD8 da memória (RATHAKRISHNAN *et al.*, 2012). Na ausência de IL-2, onde muitos pacientes com níveis indetectáveis de IL-2, como observado em Rathakrishnan (*et al.*, 2012), os níveis de IL-15 estão aumentados (KU *et al.*, 2000). Isso poderia possivelmente aumentar a proliferação de células T de memória na Dengue.

Em contraste, a relação entre a atividade das células NK e a IL-6 já foi estudada tanto em camundongos quanto em humanos, e mostrou que o aumento de IL-6 diminui a atividade citotóxica das células NK, sendo que essa diminuição foi associada com a redução dos níveis de perforina e granzima B (CIFALDI *et al.*, 2015).

Já foi mostrado que os níveis de IL-6 se encontram elevados no soro de pacientes com Dengue e em diversos estudos essa citocina estava associada com maior gravidade da doença (BUTTHEP *et al.*, 2012; GUERRERO *et al.*, 2013; MEHTA *et al.*, 2017). Apesar disso, a atividade biológica mais importante da IL-6 é a imunorregulação, e a deficiência de IL-6 pode levar à disfunção da

imunidade inata e adaptativa contra muitas infecções (VAN *et al.*, 1997; HOGE *et al.*, 2013). Além disso, os monócitos ativados são a principal fonte de IL-6 no sangue. Quando a inflamação ocorre, monócitos e macrófagos são as primeiras células reativas que produzem IL-6 (KISHIMOTO, 2006).

Já nos nossos resultados preliminares *in vitro*, embora não tenha sido realizado teste estatístico, devido a utilização de apenas dois doadores saudáveis, observamos uma tendência de aumento em ambas as subpopulações de células NK (CD56⁺ CD16^{neg} e CD56⁺ CD16⁺) duplo positivas para perforina e CD62L nas coculturas de monócitos com células NK previamente infectados pelo DENV ou ZIKV, quando comparados com controle não estimulado. Uma vez que apenas dois doadores estão representados, torna-se necessário aumentar o n amostral e avaliar a reprodutibilidade dos experimentos futuros.

Embora o subtipo CD56^{bright} seja raro no sangue (+-10% das células NK), representa um subtipo predominante nos tecidos e linfonodos. Isto pode ser justificado pelo fato das células CD56^{bright} expressarem moléculas de adesão e receptores de quimiocinas diferentes das CD56^{dim}.

As células *Natural Killer* CD56^{bright} exibem níveis elevados da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e do receptor de quimiocinas CCR7, ao contrário das células NK CD56^{dim} (CAMPBELL *et al.*, 2001; FERLAZZO, *et al.* 2004). sendo ambos (CD62L e CCR7) moléculas de *homing* que permitem o tráfego das células NK para os órgãos linfoides secundários onde se encontra a maior parte das células NK CD56^{bright}.

Já foi mostrado que a estimulação das células *Natural Killer* CD56⁺ CD16^{neg} com IL-2 induziu o aumento na expressão de CD16 e receptores KIR, além de reduzir a expressão de CCR7 e CD62L na superfície celular, levando as células NK CD56⁺ CD16⁻ adquirirem um fenótipo semelhante às NK CD56⁺ CD16⁺ (ROMAGNANI *et al.*, 2007).

Ademais, a diminuição da expressão de CD62L, CXCR3 e CCR7 em células NK CD56⁺ CD16^{neg} após estímulo com citocinas, como IL-2, é consistente com a hipótese de que durante uma resposta inflamatória essa subpopulação (CD56⁺ CD16⁻) adquire competência efetora de citotoxicidade

(típica de células CD56⁺ CD16⁺) e que essas deixam os órgãos linfoides secundários após sua ativação (ROMAGNANI, *et al.*, 2007).

Alguns estudos recentes demonstraram que provavelmente as células CD56^{bright} são precursoras das CD56^{dim} (BÉZIAT *et al.*, 2010; MORETTA, 2010).

Juelke K e colaboradores mostraram que durante a maturação das células NK de CD56^{bright} para CD56^{dim}, as células NK perdem a capacidade de responder a citocinas e ganham a habilidade de responder a estimulação de receptores ativadores (JUELKE *et al.*, 2010). Além disso, este mesmo estudo demonstrou que as células NK CD56^{dim} CD62L⁺ representam um subtipo único de células NK efectoras completas, ou seja, com mais de uma função efetora além de apresentarem alta capacidade de auto renovação (JUELKE *et al.*, 2010).

Acredita-se até o presente momento que apenas o subtipo de células CD56⁺ CD16⁺ CD62L⁺ combina o elevado potencial das células CD56^{bright} de produzir citocinas, como IFN- γ , com a capacidade de matar células-alvo, típico das células CD56^{dim}. Além disso, os autores do trabalho sugeriram que as células NK CD56^{dim} CD62L⁺ poderiam representar um estágio intermediário de diferenciação das NK entre células CD56^{bright} e CD56^{dim} CD62L^{neg}, sendo assim, um subtipo de células NK poli funcionais (JUELKE *et al.*, 2010).

Nesse contexto podemos sugerir que há duas hipóteses diferentes para explicar a ação das células NK poli funcionais durante as infecções virais. A primeira hipótese é que as células NK estariam diminuídas no sangue periférico de pacientes com Zika, já que essas células estariam atuando nos tecidos infectados. Já na segunda hipótese, o escape da detecção das células NK pelo ZIKV implicaria na diminuição da atividade dessas células, enquanto o DENV é capaz de estimular a ativação das células NK.

As células NK se comportam diferentemente *in vivo* e *in vitro*, o que pode explicar níveis diferentes de marcadores de ativação em experimentos com células de pacientes *ex vivo* e *in vitro* (GOTLIEB *et al.*, 2015). Observamos que quando os monócitos estão infectados pelo DENV ou ZIKV em cocultura com células NK, a tendência é que os monócitos não sobrevivam e essa morte é causada pelas células NK ativadas em cocultura, que reconhecem esses monócitos infectados e atuam a favor da morte dessas células alvo infectadas, diminuindo-os em porcentagem quando comparadas com os controles não

estimulados. Além disso, foi observado uma tendência de aumento percentual das células NK nas coculturas com monócitos infectados, o que evidenciou a diminuição dos monócitos. No entanto, para confirmar esse dado, seria necessário um realizar testes de citotoxicidade.

Embora o esforço intensivo nas investigações para entender a neuropatogênese relacionada com a infecção pelo ZIKV, ainda é necessário mais estudo para compreender o mecanismo de interação do mesmo com células do sistema imunológico. Visto que o vírus Zika é transmitido para a derme por meio da picada do mosquito infectado com ZIKV, os monócitos seriam uma das primeiras células imunes no sangue a interagir com o vírus quando o mesmo for para a corrente sanguínea. Assim, compreender a interação entre ZIKV e monócitos é crucial para o entendimento da infecção.

Estudos recentes estabeleceram que o vírus Zika pode infectar monócitos presentes no sangue periférico (FOO *et al.*, 2017; LUM *et al.*, 2017a; LUM *et al.*, 2017b; MICHLMAYR *et al.*, 2017).

Já foi mostrado por meio da imunofenotipagem de PBMCs de pacientes infectados com ZIKV que as células NK se tornam ativadas durante a infecção aguda. Além disso, o mesmo grupo mostrou *in vitro* que a infecção de PBMCs isoladas de doadores saudáveis levou a indução de marcadores como IFN- γ e CD107a. E, a depleção de monócitos CD14+ do sangue periférico resultou na redução desses marcadores e conseqüentemente, reduziu a atividade das células NK durante a infecção (LUM *et al.*, 2018).

Dados preliminares apontam que as populações CD16 positivas ocorrem em 5 a 10% dos monócitos circulantes (ZIEGLER-HEITBROCK, 2000; ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010).

Neste trabalho também foi analisado a frequência de monócitos após infecção pelos vírus DENV ou ZIKV. Aproximadamente 90% dos monócitos em indivíduos saudáveis pertencem a “população clássica”, a qual possui alta expressão de CD14 e não expressa CD16 (CD14+ CD16^{neg}). No presente trabalho, observou-se que justamente a frequência dessa população de monócitos CD14+ CD16+ tende a aumentar em resposta aos estímulos virais: DENV ou ZIKV em comparação com os monócitos não estimulados.

Os monócitos desempenham um papel essencial, contribuindo para a tempestade de citocinas, uma vez que são os principais produtores de citocinas pró-inflamatórias, e também tem uma alta afinidade de ligação ao endotélio, em comparação com outras populações de células (PAWLOWSKI *et al.*, 1985). Esta característica dos monócitos pode contribuir significativamente para as alterações na barreira endotelial observada em infecções grave pelo DENV, como sugerem modelos *in vitro* (KELLY *et al.*, 2012).

Corroborando com o observado neste presente trabalho, um estudo analisou a infectividade do vírus Zika em PBMCs *in vitro* e mostrou que a população de monócitos CD14⁺ CD16⁺ é o principal alvo da infecção, seguido das células dendríticas. Em monocultura de monócitos, foi visto que a frequência de monócitos CD14⁺ diminuiu após a infecção, enquanto a população CD14⁺ CD16⁺ foi significativamente aumentada durante a infecção pelo ZIKV quando comparado com controle não infectado (MICHLMAYR *et al.*, 2017).

Como os monócitos podem infiltrar em muitos tecidos, incluindo órgãos imunologicamente protegidos, são alvos ideais para a infecção já que atuam como “Cavalo de Troia”. Monócitos do sangue e macrófagos teciduais foram anteriormente sugeridos serem os maiores reservatórios para a replicação do DENV (DURBIN *et al.*, 2008).

Além disso, estudos já mostraram que monócitos CD14⁺ CD16⁺ apresentam maiores níveis de HLA-DR, comparados com monócitos clássicos, o que sugere que essa população de monócitos CD16⁺ possui maior atividade como uma célula apresentadora de antígeno (APC) (PASSLICK *et al.*, 1989).

Wong e colaboradores relataram que tanto os monócitos clássicos (CD14⁺ CD16^{neg}), quanto os não-clássicos (CD14⁺ CD16⁺) são igualmente suscetíveis a infecção pelo DENV *in vitro* (WONG *et al.*, 2012). Ademais, estudos prévios realizados pelo Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) demonstrou em 2010 que os monócitos CD14⁺ CD16⁺ constituíram uma população marcadamente aumentada em pacientes com Dengue quando comparados com indivíduos saudáveis (AZEREDO *et al.*, 2010).

Sugere-se, portanto, que os monócitos CD14⁺ CD16⁺ possuam papel importante na resposta antiviral pela infecção do DENV e ZIKV, visto que essa população aumenta em monocultura após o estímulo viral. No entanto, na

cocultura de monócitos infectados com as células NK, observamos a diminuição da frequência total de monócitos após 48h da infecção pelo DENV ou ZIKV. Concomitantemente, foi observado o aumento na frequência de células NK em cocultura com monócitos infectados em comparação com monócitos não estimulados.

Badolato-Corrêa mostrou recentemente (BADOLATO *et al.*, 2017) que a coinfeção pelo DENV e ZIKV diminuiu a capacidade das células T CD4⁺ em produzir IFN- γ , TNF- α e IL-2 em comparação com pacientes mono infectados pelo DENV ou ZIKV. Sugeriu-se dois cenários antagônicos: pessoas coinfectadas são mais imunocomprometidas do que as mono infectadas, portanto a coinfeção seria o pior cenário para esses indivíduos. Outro exemplo de potenciais efeitos adversos dessa imunossupressão é a capacidade reduzida de ativar populações de células T CD4⁺ expressando IFN- γ , TNF- e IL-2, o que pode interferir no desenvolvimento futuro de linfócitos de memória específicos ou com reação cruzada, levando a uma resposta fraca em um encontro subsequente com outros arbovírus em potencial. No outro cenário, as pessoas coinfectadas teriam um ambiente menos inflamatório do que as pessoas infectadas pela mono infecção, e assim, a coinfeção poderia levar a uma condição inflamatória reduzida que evitaria efeitos prejudiciais como a tempestade de citocinas, clássica da Dengue (BADOLATO *et al.*, 2017).

Em conjunto, nossos dados indicam o envolvimento das células NK no controle das infecções virais pelo DENV ou ZIKV. Nesse contexto, podemos sugerir que as células NK possuem papel similar tanto na infecção pelo DENV, quanto pelo ZIKV. No entanto, destacamos que a atividade citotóxica das células NK tende a ser maior na infecção pelo DENV comparado com o ZIKV, seguido pelo aumento da população de células NK CD56^{dim}.

7 CONCLUSÕES

A caracterização fenotípica e funcional das células *Natural Killer* *ex vivo* e *in vitro*, por meio da análise da frequência de subpopulações CD56^{bright} e CD56^{dim} e expressão de perforina e CD62L demonstrou que a subpopulação de células NK CD56^{dim} aparece com aumento percentual nos pacientes com Dengue em comparação com os demais grupos estudados. Além disso, células NK CD56^{bright} em pacientes com Dengue também apresentaram frequência elevada de expressão de perforina e CD62L.

Não observamos diferença significativa tanto na fenotipagem quanto na produção de citocinas no grupo de pacientes mono infectados pelo ZIKV em comparação com os doadores saudáveis devido à variação na distribuição. No entanto, esses dados ainda precisam ser investigados.

Em conjunto, nossos resultados contribuem tanto para o conhecimento acerca das células *Natural Killer* e a interação com monócitos, quanto para os mecanismos biológicos e reguladores envolvidos na resposta antiviral durante a Dengue e Zika.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, A.M.; YANG, C.; THAKAR, M.S.; MALARKANNAN, S.. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018 Aug 13;9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869. eCollection 2018.

ACOSTA, E.G.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R. Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Adv Virus Res.* 2014; 88():1-109.

ADIBI, J.J.; MARQUES, E.T.A.; CARTUS, A.; BEIGI, R.H. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *The Lancet* 387: 1587–1590. 2016.

AKONDY, R. S.; MONSON, N. D.; MILLER, J. D. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol.* 183(12):7919–30. 2009.

ANDRADE, P.; GONZALEZ, K.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. Daniela Michlmayr. *Nat Microbiol.* Nov; 2(11): 1462-1470. 2017.

ARIAS-ARIAS, J.L.; VEGA-AGUILAR, F.; CORRALES-AGUILAR, E.; HUN, L.; LORÍA, G.D.; MORA RODRIGUEZ, R. Infecção pelo Vírus da Dengue de Células do Músculo Liso Humano Primário. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 dez; 99 (6): 1451-1457. doi: 10.4269 / ajtmh.18-0175.

ATKINSON, B.; HEARN, P.; AROUGH, B.; LUMLEY, S.; CARTER, D.; AARONS, E.J.; SIMPSON, A.J.; BROOKS, T.J.; HEWSON, R. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerg Infect Dis* 22: 940. 2016.

AZEREDO, E.L.; DE OLIVEIRA-PINTO, L.M.; ZAGNE, S.M.; CERQUEIRA, D.I.; NOGUEIRA, R.M.; KUBELKA, C.F.; NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006 Feb;143.

AZEREDO, E.L.; NEVES-SOUZA, P.C.; ALVARENGA, A.R.; REIS, S.R.; TORRENTES-CARVALHO, A.; ZAGNE, S.M.; NOGUEIRA, R.M.; OLIVEIRA-PINTO, L.M.; KUBELKA, C.F. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*, v. 130, n. 2, p. 202-16. Jun 2010. ISSN 1365-2567 (Electronic) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113369> >

AZEREDO, E.L.; DOS SANTOS, F.B.; BARBOSA, L.S.; SOUZA, T.M.A.; BADOLATO-CORRÊA, J.; SÁNCHEZ-ARCILA, J.C.; NUNES, P.C.G.; DE-OLIVEIRA-PINTO, L.M.; DE FILIPPIS, A.M.; DAL FABBRO, M.; HOSCHER ROMANHOLI, I.; VENANCIO DA CUNHA, R.. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS Curr.* 2018 Feb 15;10. pii: ecurrents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5. doi: 10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5.

BADOLATO-CORRÊA, J.; SÁNCHEZ-ARCILA, J.C.; ALVES DE SOUZA, T.M.; SANTOS BARBOSA, L.; CONRADO GUERRA NUNES, P.; DA ROCHA QUEIROZ LIMA, M.; GANDINI, M.; BISPO DE FILIPPIS, A.M.; VENÂNCIO DA CUNHA, R.; LEAL DE AZEREDO, E.; DE-OLIVEIRA-PINTO, L.M.. Respostas de células T humanas à infecção pelo vírus da dengue e zika em comparação com a coinfeção dengue / zika. *Imun Inflamm Dis.* 2018 Jun; 6 (2): 194-206. doi: 10.1002 / iid3.203. Epub 2017 28 de dezembro.

BASU, A.; CHATURVEDI, U.C. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53: 287–299. 2008.

BEARCROFT, W. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 50: 442–448. 1956.

BEAULIEU, A.M.. Memory responses by natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2018 Dec;104(6):1087-1096. doi: 10.1002/JLB.1RI0917-366R. Epub 2018 Aug 29.

BECQUART P.; WAUQUIER, N.; NKOGHE, D.; NDJOYI-MBIGUINO, A.; PADILLA, C.; SOURIS, M.; LEROY, E.M.. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC InfectDis* (2010) 10:356.doi:10.1186/1471-2334-10-356.

BERAHOVICH, R. D.; LAI, N. L.; WEI, Z.; LANIER, L. L.; SCHALL, T.. JEvidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *Journal of immunology*, 177, 7833-7840. 2006.

BESNARD, M.; LASTÈRE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.M.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* 19. 2014.

BEZIAT, V.; DESCOURS, B.; PARIZOT, C.; DEBRE, P.; VIEILLARD, V.. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS one*, 5, e11966. 2010.

BHATT, S.; GETHING, P. W., BRADY, O. J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C.P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496 (7446):504-7. 2013.

BIRON, C. A.; TURGISS, L. R.; WELSH, R. M. Increase in NK cell number and turnover rate during acute viral infection. *J. Immunol.* 131:1539. 1983.

BIRON, C.A.; BYRON, K.S.; SULLIVAN, J.L.. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* 320:1731–35. 1989.

BLOHM, G.M.; LEDNICKY, J.A.; MÁRQUEZ, M.; WHITE, S.K.; LOEB, J.C.; PACHECO, C.A.; NOLAN, D.J.; PAISIE, T.; SALEMI, M.; RODRÍGUEZ-MORALES, A.J.; GLENN MORRIS, J. JR.; PULLIAM, J.R.C.; PANIZ-MONDOLFI, A.E.. Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clin Infect Dis.* 2018 Mar 19;66(7):1120-1121. doi: 10.1093/cid/cix968.

BRADY, O.J.; GETHING, P.W.; BHATT, S.; MESSINA, J.P.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; MOYES, C.L.; FARLOW, A.W.; SCOTT, T. W.; HAY, S. I. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760).

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, volume 49 em 2016. ISSN 9352-7864.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, volume 50 em 2017. ISSN 9352-7864.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, volume 49 SE 30 em 2018. ISSN 9352-7864. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/21/Publicacao-BE-2018-SE-30.pdf>>.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, volume 49 SE 36 em 2018. ISSN 9352-7864. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/BE-N---40-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-at---a-Semana-Epidemiol--gica-SE-36-de-2018.pdf>>.

BOLITHO, P.; VOSKOBOINIK, I.; TRAPANI, J. A.. SMYTH, M. J.. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 339–347. 2007.

BONILLA, F.A.; PETTGEN, H.C. “Adaptive immunity”. *J. Allergy Clin Immunol.* 1125 (2 Suppl 2): S33-40. 2010.

BORN, T.L.; MORRISON, L.A.; ESTEBAN, D.J.; VANDENBOS, T.; THEBEAU, L.G.; CHEN, N.; SPRIGGS, M.K.; SIMS, J.E.; BULLER, R.M. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3246-54. PubMed PMID: 10706717.

BOSSI, G.; GRIFFITHS, G. M. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature medicine*, 5, 90-96. 1999.

BOUVIER, M.H.C. Class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature Reviews Immunology*, 9, 503-513), 2009.

BOZZA, F.A.; CRUZ, O.G.; ZAGNE, S.M.; AZEREDO, E.L.; NOGUEIRA, R.M.; ASSIS, E.F.; Bozza, P.T.; KUBELKA, C.F.. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008 Jun 25; 8:86.

BRASIL, P.; PEREIRA, J.P. JR.; MOREIRA, M.E.; RIBEIRO NOGUEIRA, R.M.; DAMASCENO, L.; WAKIMOTO, M.; RABELLO, R.S.; VALDERRAMOS, S.G.; HALAI, U.A.; SALLES, T.S.; ZIN, A.A.; HOROVITZ, D.; DALTRO, P.; BOECHAT, M.; RAJA GABAGLIA, C.; CARVALHO DE SEQUEIRA, P.; PILOTTO, J.H.; MEDIALDEA-CARRERA, R.; COTRIM DA CUNHA, D.; ABREU DE CARVALHO, L.M.; PONE, M.; MACHADO SIQUEIRA, A.; CALVET, G.A.; RODRIGUES BAIÃO, A.E.; NEVES, E.S.; NASSAR DE CARVALHO, P.R.; HASUE, R.H.; MARSCHIK, P.B.; EINSPIELER, C.; JANZEN, C.; CHERRY, J.D.; BISPO DE FILIPPIS, A.M.; NIELSEN-SAINES, K.. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016 Dec 15;375(24):2321-2334. Epub 2016 Mar 4.

BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J.. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60. 1996.

BUTTHEP, P.; CHUNHAKAN, S.; YOKSAN, S.; TANGNARARATCHAKIT, K.; CHUANSUMRT, A.. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *The Pediatric infectious disease journal.* 2012;31(12):e232–8. pmid:22926216.

CAO-LORMEAU, V.-M; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTERE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A.L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S.K.; WILLISON, H.J.; MIUSSET, L.; MANUGUERRA, J.C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H.P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHÉ, F. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, v. 387, n. 10027, p. 1531– 1539, abr. 2016.

CALISHER. Printed in Great Britain Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. 1989. *J. gen. Virol.* Vol: 70, 37-43.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A.S.O.; SAMPAIO, S.A.; DE FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAUJO, E.S.M.; SEQUEIRA, P.C.; MENDONÇA, M.C.L.; OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D.A.; SCHRAGO, C.G.; THOMPSON, F. L.; BRASIL, P.; DOS SANTOS, F.B.; NOGUEIORA, R.M.R.; TANURI, A.; DE FILIPPIS, A.M.B.. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.

CAMPBELL, J.J.; QIN, S.; UNUTMAZ, D.; SOLER, D.; MURPHY, K.E.; HODGE, M.R.; WU, L.; BUTCHER, E.C.. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 2001; 166: 6477–6482.

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

CARDOSO, C. W.; PAPLOSKI, I.A.; KIKUTI, M.; RODRIGUES, M.S.; SILVA, M.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I.; KITRON, U.; REIS, M.G.; RIBEIRO, G.S. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, dez. 2015.

CDC. Zika virus. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. December 5, 2016. <http://www.cdc.gov/zika/index.html>.

CERBINO-NETO, J.; MESQUITA, E.C.; SOUZA, T.M.; PARREIRA, V.; WITTLIN, B.B.; DUROVNI, B.; LEMOS, M.C.; VIZZONI, A.; BISPO DE FILIPPIS, A.M.; SAMPAIO, S.A.; GONCALVES BDE, S.; BOZZA, F.A.. Clinical manifestations of Zika virus infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1318-1320. 2016.

CHAUDHARY, V.; YUEN, K.S.; CHAN, J.F.; CHAN, C.P.; WANG, P.H.; CAI, J.P.; ZHANG, S.; LIANG, M.; KOK, K.H.; CHAN, C.P.; YUEN, K.Y.; JIN, D.Y.. Selective activation of type II interferon signaling by Zika virus S5 protein. *J Virol.* 2017; 91(14): pii:e00163-17.

CHAVES, B.A.; ORFANO, A.S.; NOGUEIRA, P.M.; RODRIGUES, N.B.; CAMPOLINA, T.B.; NACIF-PIMENTA, R.; PIRES, A.C.A.M.; JÚNIOR, A.B.V.; PAZ, A.D.C.; VAZ, E.B.D.C.; GUERRA, M.D.G.V.B.; SILVA, B.M.; DE MELO, F.F.; NORRIS, D.E.; DE LACERDA, M.V.G.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. *J Infect Dis.* Jul 13;218(4):563-571. doi: 10.1093/infdis/jiy196. 2018.

CHEN, R. F.; LIU, J. W.; YEH, W-T.; WANG, L; CHANG, J.C.; YU, H.R.; CHENG, J.T.; YANG, K.D. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44:43–50. 2005.

CHUANG, Y. C., LEI, H. Y., LIN Y. S., LIU, H. S.; WU, H. L.; YEH, T. M. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol.* 187(12):6483-90. 2011.

CIFALDI, L.; PRENCIPE, G.; CAIELLO, I.; BRACAGLIA, C.; LOCATELLI, F.; DE BENEDETTI, F.; STRIPPOLI, R.. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Nov;67(11):3037-46. doi: 10.1002/art.39295.

CIMINI, E.; CASTILLETI, C.; SACCHI, A.; CASETTI, R.; BORDONI, V.; ROMANELLI, A.; TURCHI, F.; MARTINI, F.; TUMINO, N.; NICASTRI, E.; CORPOLONGO, A.; DI CARO, A.; KOBINGER, G.; ZUMLA, A.; CAPOBIANCHI, M.R.; IPPOLITO, G.; AGRATI, C.. Human Zika infection induces a reduction of IFN- γ producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V δ 2 T-cells. *Sci Rep.* 2017 Jul 24;7(1):6313. doi: 10.1038/s41598-017-06536-x.

COLONNA, M.; NAKAJIMA, H.; NAVARRO, F.; LÓPEZ-BOTET, M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 66, 375–381. 1999.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* v. 22. n.11, p. 633-40, Nov 2001. ISSN 1471-4906 (Print). 1471-4906 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698225> >.

COSTA, V.V.; FAGUNDES, C.T.; VALADÃO, D.F.; CISALPINO, D.; DIAS, A.C.; SILVEIRA, K.D.; KANGUSSU, L.M.; ÁVILA T.V.; BONFIM, M.R.; BONAVENTURA, D.; SILVA, T.A.; SOUSA, L.P.; RACHID, M.A.; VIEIRA, L.Q.; MENEZES, G.B.; DE PAULA, A.M.. Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM, Souza DG. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1663. doi: 10.1371/journal.pntd.0001663. Epub 2012 May 29.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. *The American Journal of Pathology* 182: 1950–1961). 2013.

COSTA, V.V.; YE, W.; CHEN, Q.; TEIXEIRA, M.M.; PREISER, P.; OOI, E.E.; CHEN, J.. Dengue Virus-Infected Dendritic Cells, but Not Monocytes, Activate Natural Killer Cells through a Contact-Dependent Mechanism Involving Adhesion Molecules. *MBio.* 2017 Aug 1;8(4). pii: e00741-17. doi: 10.1128/mBio.00741-17.

CRUZ-OLIVEIRA, C.; FREIRE, J.M.; CONCEIÇÃO, T.M.; HIGA, L.M.; CASTANHO, M.A.R.B; DA POIAN, A.T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* 39: 155–170, 2015.

CUAUDHARY, V.; YUEN, K.S.; CHAN, J. F.; CHAN, C.P.; WANQ, P.H.; CAI, J.P.; ZHANQ, S.; LIANG, M.; KOK, K.H.; YEUN, K. Y.; JIN, D.Y. Selective activation of type II interferon signaling by Zika virus NS5 protein, *Journal of Virology*, vol. 91, no. 14, pp. e00163– e00117, 2017.

DANG, J. TIWARI, S.K.; LICHINCHI, G.; QIN, Y.; PATIL, V.S.; EROSHKON, A.M.; RANA, T.M.. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, v. 19, n. 2, p. 258-65, Aug 04 2016. ISSN 1875-9777 (Electronic) 875-9777 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27162029> >.

DAVIS, Z.B.; COOLEY, S.A.; CICHOCKI, F.; FELICES, M.; WANGEN, R.; LUO, X.; DEFOR, T.E.; BRYCESON, Y.T.; DIAMOND, D.J.; BRUNSTEIN, C.; BLAZAR, B.R.; WAGNER, J.E.; WEISDORF, D.J.; HOROWITZ, A.; GUETHLEIN, L.A.; PARHAM, P.; VERNERIS, M.R.; MILLER, J.S.. Adaptive natural killer cell and killer cell immunoglobulin-like receptor-expressing T cell responses are induced by cytomegalovirus and are associated with protection against cytomegalovirus reactivation after allogeneic donor hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 1653–1662. 2015.

DE HAAS, M.; KOENE, H.R.; KLEIJER, M.; DE VRIES, E.; SIMSEK, S.; VAN TOL, M.J.; ROOS, D.; VON DEM BORNE, A.E.. A triallelic Fcγ receptor type IIIa polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell FcγRIIIa. *J. Immunol.* 156:3948–55. 1996.

DE SOUZA, T.M.A.; RIBEIRO, E.D.; CORRÊA, V.C.E.; DAMASCO, P.V.; SANTOS, C.C.; DE BRUYCKER-NOGUEIRA, F.; CHOUIN-CARNEIRO, T.; FARIA, N.R.D.C.; NUNES, P.C.G.; HERINGER, M.; LIMA, M.D.R.Q.; BADOLATO-CORRÊA, J.; CIPITELLI, M.D.C.; AZEREDO, E.L.; NOGUEIRA, R.M.R.; DOS SANTOS, F.B.. Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. *Viruses.* 2018 Nov 12;10(11). pii: E623. doi: 10.3390/v10110623.

DE VRIES, E.; KOENE, H.R.; VOSSEN, J.M.; GRATAMA, J.W.; VON DEM BORNE, A.E.; WAAIJER, J.L.M.; HARALDSSON, A.; DE HAAS, M.; VAN TOI, M.J.D.. Identification of an unusual Fcγ receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood* 88:3022–27. 1996.

DEEN, J. L.; HARRIS, E.; WILLS, B.; BALMASEDA, A.; HAMMOND, S. N.; ROCHA, C. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 2006 Jul 8;368(9530):170-3. PubMed PMID: 16829301.

DEGUINE, J.; BOUSSO, P.. Dynamics of NK cell interactions in vivo. *Immunol. Rev.* 251, 154–159. 2013.

DEJNIRATTISAI, W.; DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; ROUVINSKI, A.; BARBA-SPAETH, G.; DUANGCHINDA, T.; SAKUNTABHAI, A.; CAO-LPRMEAU, V.M.; MALASIT, P.; REY, F.A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G.R.. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*, v. 17, n. 9, p. 1102-8, Sep 2016. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339099> >.

DEVIGNOT, S.; SAPET, C.; DUONG, V.; BERGON, A.; RIHET, P.; ONG, S.; LORN, P. T.; CHROEUNG, N.; NGEAV, S.; TOLOU, H. J.; BUCHY, P.; COUISSINIER-PARIS, P. Genome-wide expression profiling deciphers host responses altered during dengue shock syndrome and reveals the role of innate immunity in severe dengue. *PLoS One*. 2010;5(7):e11671. PubMed PMID: 20652028. Pubmed Central PMCID: 2907396.

DIAGNE, C. T.; CHEIKH, T. D.; DIAWO, D.; OUMAR, F.; YAMAR, B., OUSMANE, F., ALIOUNE, G.; IBRAHIMA, D.; SCOTT, C. W.; AMADOU, A. S.; MAWLOUTH, D. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC infectious diseases*, v. 15, p. 492, 2015.

DICK, G. W. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 47, n. 1, p. 13–48, jan. 1953.

DICK, G. W.; KITCHEN, S.; HADDOW, A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952.

DISANTO, J.P.; MULLER, W.; GUY-GRAND, D.; FISCHER, A.; RAJEWSKY, K.. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:377–381.

D'ORTENZIO, E.; MATHERON, S.; YAZDANPANA, Y.; DE LAMBALLERIE, X.; HUBERT, B.; PIORKOWSKI, G.; MAQUART, M.; DESCAMPS, D.; DAMOND, F.; LEPARC-GOFFART, I. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N Engl J Med*. ;374:2195–2198). 2016.

DOUGHTY, C.T.; YAWETZ, S.; LYONS, J.. Emerging Causes of Arbovirus Encephalitis in North America: Powassan, Chikungunya, and Zika Viruses. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17: 12. 2017.

DOUGLAS, M.W.; KESSON, A.M.; KING, N.J.. CTL recognition of west Nile virus-infected fibroblasts is cell cycle dependent and is associated with virus-induced increases in class I MHC antigen expression. *Immunology* 82(4), 561–570. 1994.

DREWS, E.; ADAM, A.; HTOO, P.; TOWNSLEY, E.; MATHEW, A..
Upregulation of HLA-E by dengue and not Zika viruses. *Clin Transl Immunology*. 2018 Sep 25;7(9):e1039. doi: 10.1002/cti2.1039. eCollection 2018.

DUFFY, M. R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI, R.S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A.J.; LAVEN, J.; KOSOV, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B.J.; FISCHER, M.; HAYES, E.B. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

DURBIN, A.P.; VARGAS, M.J.; WANIONEK, K.; HAMMOND, S.N.; GORDON, A.; ROCHA, C.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E.; Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008; 376:429–435. [PubMed: 18452966].

DUYEN, H.T.L.; NGOC, T.V.; HÁ, D.T.; HANG, V.T.T.; KIEU, N.T.T.; YOUNG, P.R.; FARRAR, J.J.; SIMMONS, C.P.; WOLBERS, M.; WILLS, B.A.. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J Infect Dis*. 2011. May;203(9):1292–300. 10.1093/infdis/jir014.

EISSENS, D. N.; SPANHOLTZ, J.; VAN DER MEER, A.; VAN CRANENBROEK, B.; DOLSTRA, H.; KWEKKEBOOM, J.; PREIJERS, F. W. M. B.; JOOSTEN, I.. Defining Early Human NK Cell Developmental Stages in Primary and Secondary Lymphoid Tissues. *PloS one*, 7, e30930. 2012.

EPELBOIN, Y.; TALAGA, S.; EPELBOIN, L.; DUSFOUR. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11: e0005933. 2017.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *The Journal of hygiene*, v. 83, n. 2, p. 213–9, out. 1979.

FALCONAR, A. K. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin Vaccine Immunol*. 14(5):493-504. 2007.

FANG, X.; HU, Z.; SHANG, W.; ZHU, J.; XU, C.; RAO, X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Nov;66(2):134-46. PubMed PMID: 22624675.

FARIA, N.R.; NOGUEIRA, R.M.; DE FILIPPIS, A.M.; SIMÕES, J.B.; NOGUEIRA F. DE B.; DA ROCHA QUEIROZ LIMA, M.; DOS SANTOS, F.B.. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2095. doi: 10.1371/journal.pntd.0002095. Epub 2013 Mar 14.

FAURIAT, C., LONG, E. O., LJUNGGREN, H. G. & BRYCESON, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 115, 2167-2176. 2010.
FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A.. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001;97:14–32.

FERLAZZO, G., THOMAS, D.; LIN, S.L; GOODMAN, k.; MORANDI B.; MULLER, W. A.; MORETTA A.; MÜNZ, C.. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol*. 2004; 172:1455. 2003.

FLORES, M. S.; BURGESS, T. H.; RAJNIK, M. Zika virus: A primer for clinicians. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, v. 83, n. 4, p. 261–270, 2016.

FOO, S.S.; CHEN, W.; CHAN, Y.; BOWMAN, J.W.; CHANG, L.C.; CHOI, Y.; YOO, J.S.; GE, J.; CHENG, G.; BONNIN, A.; NIELSEN-SAINES, K.; BRASIL, P.; JUNG, J.U.. Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol* 2:1558–1570. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0016-3>. 2017.

FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J.L.C.; BLITVICH, B.J.J.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; HADDOW, A.D.; LANCIOTTI, R.S.; TESH, R.B. Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 17: 880–882. 2011.

FREEMAN, M.C.; COYNE, C.B.; GREEN, M.; WILLIAMS, J.V.; SILVA, L.A.; Emerging arboviruses and implications for pediatric transplantation: A review. *Pediatr Transplant*. 2019 Feb;23(1):e13303. doi: 10.1111/petr.13303. Epub 2018 Oct 19.

FREUD, A. G.; BECKNELL, B.; ROYCHOWDHURY, S.; MAO, H. C.; FERKETICH, A. K.; NUOVO, G. J.; HUGHES, T. L.; MARBURGER, T. B.; SUNG, J.; BAIOCCHI, R. A.; GUIMOND, M.; CALIGIURI, M. A.. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56(bright) natural killer cells. *Immunity*, 22, 295-304. 2005.

FREUD, A.G.; MUNDY-BOSSE, B.L.; YU, J.; CALIGIURI, M.A.. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*. 2017 Nov 21;47(5):820-833. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.

FRIBERG, H.; BEAUMIER, C. M.; PARK, S.; PAZOLES, P.; ENDY, T. P.; MATHEW, A.; CURRIER, J. R.; JARMAN, R. G.; ANDERSON, K. B.; HATCH, S.; THOMAS, S. J.; ROTHMAN, A. L.. Protective versus pathologic pre-exposure cytokine profiles in dengue virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(12), e0006975. doi:10.1371/journal.pntd.0006975). 2018.

FRIED, J.R.; GIBBONS, R.V.; KALAYANAROOJ, S, THOMAS, S.J.; SRIKIATKHACHORN, A.; YOON, I.K.; JARMAN, R.G.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L.; CUMMINGS, D.A. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS neglected tropical diseases*. 4(3):e617. 2010. PubMed PMID: 20209155. Pubmed Central PMCID: 2830471.

FU, B.; TIAN, Z.; WEI, H.. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 2014 Apr;141(4):483-9. doi: 10.1111/imm.12224.

GALY, A.; TRAVIS, M.; CEN, D.; CHEN, B.. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995;3:459–473.

GANDINI, M.; REIS, S.R.; TORRENTES-CARVALHO, A.; AZEREDO, E.L.; FREIRE, M.D.A.S.; GALLER, R.; KUBELKA, C.F.. Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF- α and IFN- α profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106(5):594-605.

GANDINI, M.; GRAS, C.; AZEREDO, E.L.; PINTO, L.M.; SMITH, N.; DESPRES, P.; DA CUNHA, R.V.; DE SOUZA, L.J.; KUBELKA, C.F.; HERBEUVAL, J.P.. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis* 2013. 7:e2257. doi:10.1371/journal.pntd.0002257.

GANDINI, M.. Dengue e Imunologia Inata: Estudo dos Fatores Antivirais e Citotóxicos em Células Dendríticas Plasmacitoides e Células NK durante Infecção pelo Vírus Dengue. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

GANDINI, M.; PETITINGA-PAIVA, F.; MARINHO, C.F.; CORREA, G.; DE OLIVEIRA-PINTO, L.M.; DE SOUZA, L.J.; CUNHA, R.V.; KUBELKA, C.F.; DE AZEREDO, E.L.. Dengue Virus Induces NK Cell Activation through TRAIL Expression during Infection. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5649214. doi: 10.1155/2017/5649214. Epub 2017 Sep 5.

GARCIA-BLANCO, M.A.; VASUDEVAN, S.G.; BRADRICK, S.S.; NICCHITTA, C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res*. 2016 Oct;134:244-249. doi:10.1016/j.antiviral.2016.09.010. Epub 2016 Sep 22.

GARCIA-TAPIA, D.; LOIACONO, C.M.; KLEIBOEKER, S.B. Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 110:229–244. 2006.

GARRIDO, F.; RUIZ-CABELLO, F.; APTSIAURI, N.. Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 259–271. 2017.

GLASNER, A.; OIKNINE-DJIAN, E.; WEISBLUM, Y.; DIAB, M.; PANET, A.; WOLF, D.G.; MANDELBOIM, O. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J Virol.* Oct 27;91(22). pii: e00785-17. doi: 10.1128/JVI.00785-17. Print 2017 Nov 15. 2017.

GOULD, E.; PETTERSSON J.; HIGGS S.; CHARREL R.; DE LAMBALERRIE, X. Emerging arboviruses: why today? *Open Health* 4:1–13. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>.

GOURINAT, A.C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C.; DUPONT-ROUZEYROL, M.. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):84-6. doi: 10.3201/eid2101.140894.

GOTLIEB N.; ROSENNE, E.; MATZNER, P.; SHAASHUA, L.; SORSKI, L.; BEN-ELIYAHU, S.. The misleading nature of in vitro and ex vivo findings in studying the impact of stress hormones on NK cell cytotoxicity. *Brain Behav Immun* 45:277–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.020>. 2015.

GRARD, G. et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, 2014.

GREEN, S., VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; NISALAK, A.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol.* 59(3):329-34. 1999a.

GREEN, S.; PICHYANGKUL, S.; VAUGHN, D.W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A. KURANE, I.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, v. 180, n. 5, p. 1429-35, Nov 1999b. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515800> >.

GREGORY, CJ; ODUYEBO, T; BRAULT, AC; BROOKS, J.T.; CHUNG, K-W.; HILLS, S.; KUEHNERT, M.J.; MEAD, P.; MEANEY-DELMAN, D.; RABE, I.; STAPLES, E.; PETERSEN, L.R. Modes of Transmission of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 216: S875–S883. 2017.
GRIFFIN, B.D.; VERWEIJ, M.C.; WIERTZ, E.J.. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet. Microbiol.* 143, 89–100. 2010.

GROTH, A.; KLOSS, S.; VON STRANDMANN, E.P.; KOEHL, U.; KOCH, J. Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. *J Innate Immun.* 2011;3(4):344-54. PubMed PMID: 21576922.

GRZALJA, N.; CICVARIC, T.; KNEZEVIC, D.; KUCHARIC, J.; SUSTIC, A.; BAKOTA, B.; KOMEN, S.; TOKMADZIC, V.S.. Frequency and perforin expression of different lymphocyte subpopulations in patients with lower limb fracture and thoracic injury. *Injury.* 2017 Nov;48 Suppl 5:S1-S7. doi: 10.1016/S0020-1383(17)30730-1.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* New York: CAB International; p. 1-22. 1997.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* Jul;11(3):480-96. 1998. PubMed PMID: 9665979.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 2002;33(4):330–342.

GUBLER, D.J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop Med Health.* 2011; 39 (4): 3–11. pmid:22500131.

GUERRERO, C.D.; ARRIETA, A.F.; RAMIREZ, N.D.; RODRIGUEZ, L.S.; VEJA, R.; BOSCH, I. , NÁRVAEZ, C.F.; SALGADO, D.M.. High plasma levels of soluble ST2 but not its ligand IL-33 is associated with severe forms of pediatric dengue. *Cytokine.* 2013;61(3):766–71. pmid:23357301.

GUNTHER, V.J.; PUTNAK, R.; ECKELS, K.H.; MAMMEN, M.P.; SCHERER, J. M.; LYONS, A.; SZTEIN, M.B.; SUN, W.. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine.* 2011 May 17; 29(22):3895-904.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H.S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M.B.; PELEGRINO, J.L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R.W.. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 8(12):S7-16. 2010. (Review).

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. P.; BRAVO, J.; SOLER, M.; VAZQUEZ, S.; MORIER, L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 42(2):179-84. 1990.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. Jan 29;239(4839):476-81. 1988. PubMed PMID: 3277268.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*. 146(1):201-17. 1997.

HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 60:421-67. 2003. PubMed PMID: 14689700.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S; EKCHARLYAWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLERTLOP, N.; PERERECA-LECOIN, M.; SURASOMBATPATTANA, P.; TALIGNANI, L.; THOMAS, F.; CAO-LORMEAU, V.-M.; CHOUMET. V.; BRIANT, L.; DESPRÈS, P.; AMARA, A.; YSSEL, H.; MOSSÉ, D. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*, v. 89, n. 17, p. 8880–96, set. 2015. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085147> >.

HANLEY, K.A.; WEAVER, S.C. in *Origin and Evolution of Viruses* (Second Edition), 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374153-0.00016-3>.

HANSEN, T. H. & BOUVIER, M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature Reviews Immunology*, 9, 503-513, 2009.

HART, O.M.; ATHIE-MORALES, V., O'CONNOR, G.M.; GARDINER, C.M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol*, v. 175, n. 3, p. 1636-42. Aug 01 2005. ISSN 0022-1767 (Print).

HASAN, S.; JAMDAR, S. F.; ALALOWI, M.; AL AGEEL AL BEAIJI, S. M. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *J Int Soc Prev Community Dent*. Jan-Feb; 6(1): 1–6. 2016. doi: 10.4103/2231-0762.175416. PMID: PMC4784057.

HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, set. 2009.

HE, J. S.; OSTERGAARD, H. L. CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *Journal of immunology*, 179, 2339-2348. 2007.

HEINTEL, T.; SESTER, M.; RODRIGUEZ, M.M.; KRIEG, C.; SESTER, U.; WAGNER, R.; PEES, H.; GÄRTNER, B.; MAIER, R.; MEYERHANS, A..The fraction of perforinexpressing HIV-specific CD8 T cells is a marker for disease progression in HIV infection. *AIDS* 2002; 16:1497–1501.

HEINTEL, T.; SESTER, M.; RODRÍGUEZ, M.M.; HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R.. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 3:376-396. 1990.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 3, p. 1–4, 22 jan. 2016.

HERBERMAN, R.B.; NUNN, M.E.; HOLDEN, H.T.; LAVRIN; D.H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*.16(2):230-9. Aug 15 1975. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1080480> >.

HERING, M. Vírus dengue tipo 4 no estado do Rio de Janeiro: epidemiologia, caracterização de casos confirmados e estudos evolutivos dos vírus circulantes. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

HERSHKOVITZ, O.; ZILKA, A.; BAR-ILAN, A.; ABUTBUL, S.; DAVIDSON, A. MAZZON, M.; KÜMMERER, B.M.; MONSOENGO, A.; JACOBS, M.; PORGADOR, A. Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. *J Virol*. 2008 Aug;82(15):7666-76. PubMed PMID: 18508882. Pubmed Central PMCID: 2493327.

HIDARI, K.I.P.J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health* 39: 37–43. 2011.

HOGUE, J.; YAN, I.; JÄNNER, N.; SCHUMACHER, V.; CHALARIS, A.. STEINMETZ, O.M.; ENGEL, D.R.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN,S.; MITTRÜCKER, H.W.. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol*. 2013 Jan 15; 190(2):703-11.

HOMCHAMPA, P.; SARASOMBATH, S.; SUVATTE, V.; VONGSKUL, M. Natural killer cells in Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Asian Pac J Allergy Immunol* 6(2):95–102. 1988.

HORSTICK, O.; RUNGE-RANZINGER, S.; NATHAN, M.B.; KROEGER, A. Dengue vector-control services: how do they work? A systematic literature review and country case studies. *T Roy Soc Trop Med H*. 2010; 104 (6): 379–386. pmid:20400169.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology*, 71, 907-920, 2002.

IOVINE, N.M.; LEDNICKY, J.; CHERABUDDI, K.; CROOKE, H.; WHITE, S.K.; LOEB, J.C.; CELLA, E.; CICCOCCHI, M.; SALEMI, M.; MORRIS, J.G. JR. Coinfection With Zika and Dengue-2 Viruses in a Traveler Returning From Haiti, *Clin Infect Dis*. 2017 Jan 1;64(1):72-75. Epub 2016 Sep 29. Clinical Presentation and Genetic Analysis. 2016.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, v. 5, n. 10, p. 987-95, Oct 2004. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454922> >.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R.. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 327(5963):291-5). 2010.

JAWAHAR, S.; MOODY, C.; CHAN, M.; FINBERG, R.; GEHA, R.; CHATILA, T.. Natural killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin. Exp. Immunol*. 103:408–13. 1996.

JAIN, A.; PASARE, C.. Innate control of adaptive immunity: beyond the three-signal paradigm. *J. Immunol*. 198, 3791–3800. 2017.

JAMIESON, A. M.; ISNARD, P.; DORFMAN, J. R.; COLES, M. C.; RAULET, D. H. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *Journal of immunology*, 172, 864-870, 2004.

JESSIE, K.; FONG, M.Y.; DEVI, S.; LAM, S.K.; WONG, K.T. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 1411–1418. 2004.

JIANG, H.; GONG, H.; ZHANG, Q.; GU, J.; LIANG, L.; ZHANG, J.. Decreased expression of perforin in CD8+ T lymphocytes in patients with Mycobacterium tuberculosis infection and its potential value as a marker for efficacy of treatment. *J Thorac Dis*. 2017 May;9(5):1353-1360. doi: 10.21037/jtd.2017.05.74.

JOHNSON, B.W.; RUSSELL, B.J.; LANCIOTTI, R.S.. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. 2005. *J Clin Microbiol*. 43: 4977-4983.

JOST, S.; ALTFELD, M.. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:163-94. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100001. Epub 2013 Jan 3.

JUELKE, K.; KILLIG, M.; LUETKE-EVERSLOH, M.; PARENTE, E.; GRUEN, J.; MORANDI, B.; FERLAZZO, G.; THIEL, A.; SCHMITT-KNOSALLA, I.; ROMAGNANI, C. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1299-307. doi: 10.1182/blood-2009-11-253286. Epub 2010 May 26.

KALAYANAROOJ, S.; GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D.; GREEN, S.; NISALAK, A.; JARMAN, R.G.; MAMMEN, M.P. JR; PERNG, G.C. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis*. 195:1014–1017. 2007.

KAM, Y. W.; LEITE, J. A.; LUM, F. M.; TAN, J.; LEE, B.; JUDICE, C. C.; TEIXEIRA, D.; ANDREATA-SANTOS, R.; VINOLO, M. A.; ANGERAMI, R.; RESENDE, M. R.; FREITAS, A.; AMARAL, E.; JUNIOR, R. P.; COSTA, M. L.; GUIDA, J. P.; ARNS, C. W.; FERREIRA, L.; RÉNIA, L.; PROENÇA-MODENA, J. L.; NG, L.; COSTA, F.. Zika-Unicamp Network. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. *The Journal of infectious diseases*, 216(2), 172-181, 2017.

KANLAYA, R.; PATTANAKITSAKUL, S.; SINCHAIKUL, S.; CHEN, S-T; THONGBOONKERD, V. Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *J. Proteome Res.* 8: 2551–2562, 2009.

KARRE, K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nature immunology*, 9, 477-480. 2008.

KATZELNICK, L.C.; GRESH, L.; HALLORAN, M.E.; MERCADO, J.C.; KUAN, G.; GORDON, A.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E.. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017 Nov 17;358(6365):929-932. doi: 10.1126/science.aan6836. Epub 2017 Nov 2.

KELLEY, J.F.; KAUFUSI, P.H.; NERURKAR, V.R.. Dengue Hemorrhagic Fever-Associated Immunomediators Induced via Maturation of Dengue Virus Nonstructural 4B Protein in Monocytes Modulate 89 Endothelial Cell Adhesion Molecules and Human Microvascular Endothelial Cells Permeability. *Virology* 422: 326–337. 2012.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; PROSS, H.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology*. 5(2):117-21. Feb 1975. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1086218> >.

KILPATRICK, A.M.; RANDOLPH, S.E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*. 2012;380(12):61151–61159.

KISHIMOTO, T.. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 Suppl 2:S2.

KLIKS, S.C.; NIMMANITYA, S.; NJSALAK, A.; BURKE, D.S. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. Mar;38(2):411-9. 1988. PubMed PMID: 3354774.

KLIKS, S.C.; NJSALAK, A.; BRANDT, W.E.; WAHL, L.; BURKE, D.S. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. Apr;40(4):444-51. 1989. PubMed PMID: 2712199.

KONDO, M.; WEISSMAN, I.L.; AKASHI, K.. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91:661–672.

KOU, Z.; QUINN, M.; CHEN, H.; RODRIGO, W.W.; ROSE, R.C.; SCHLESINGER, J.J.; JIN, X. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. ;80:134–146). 2007.

KRAEMER, M. U. G.; , SINKA, E.M.; DUDA, K.A.; MYLNE, A.; SHEARER, F.M.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; BARKER, C. M.; MOORE, C. G.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G. E.; BORTEL, W.V.; HENDRICKX, G.; SCHAFFNER, F.; WILLIAM WINT, G.R.; ELYAZAR, I.R.F.; TENG, H.J.; HAY, S.L. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* occurrence. Scientific data, v. 2, p. 150035, 2015.

KRZEWSKI, K.; COLIGAN, J.E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol*. 3:335. PubMed PMID: 23162553. Pubmed Central PMCID: 3494098. 2012.

KU, C.C.; MURAKAMI, M.; SAKAMOTO, A.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.. Control of Homeostasis of CD8+ Memory T Cells by Opposing Cytokines. *Science* 288: 675–678. 2000.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMAN, M. G.; PLETNEV, S.V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C.T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, mutation and fusion. *Cell*. 108(5):717-725. 2002.

KUMAR, A.; HOU, S.; AIRO, A.M.; LIMONTA, D.; MANCINELLI, V.; BRANTON, W.; POWER, C.; HOBMAN, T.C.. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep*. 2016 Dec;17(12):1766-1775. Epub 2016 Oct 24.

KURANE, I.; HEBBLE WAITE, D.; BRANDT, W.E.; ENNIS, F.A.. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* (1984) 52:223–30.

KURANE, I.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; MEAGER, A.; ENNIS, F.A. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *AmJTrop MedHyg* (1993) 48:222–9.

LAN, N. T. P. e HIRAYAMA, K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop Med Health*. 39: 73–81. 2011.

LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V.. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(3):545-51.

LANCIOTTI, R.S.; KOSOY, O.L.; LAVEN, J.J.; PANELLA, A.J.; VELEZ, J.O.; LAMBERT, A.J.; CAMPBELL, G.L.. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007 May;13(5):764-7.

LANCIOTTI, R.S.; KOSOY, O.L.; LAVEN, J.J.; VELEZ, J.O.; LAMBERT, A.J.; JOHNSON, A.J.; STANFIELD, S.M.; DUFFY, M.R.. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287.

LANIER, L.L.; LE, A.M.; CIVIN, C.I.; LOKEN, M.R.; PHILLIPS, J.H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* V. 136, n. 12, p. 4480-6, Jun 15 1986a. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086432> >.

LANIER, L.L.; PHILLIPS, J.H.; HACKETT, Jr.; TUTT, M.; KUMAR, V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol*, V. 137 , N. 9, p. 2735-9. Nov 1 1986b. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3489775> >.

LANIER, L.L.; TESTI, R.; BINDL, J.; PHILLIPS, J.H. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 169, 2233–2238.1989.

LANIER, L.L. Natural killer cell receptor signaling. *Current opinion in immunology*, 15, 308-314. 2003.

LAURETI, M.; NARAYANAN, D.; RODRIGUEZ-ANDRES, J.; FAZAKERLEY, J.K.; KEDZIERSKI, L.. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol.* 2018 Sep 26; 9:2180. doi: 10.3389/fimmu.2018.02180. eCollection 2018.

LAZEAR, H.M.; DIAMOND, M.S.. Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the western hemisphere. *J. Virol.* 90, 4864-4875. 2016.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; Salas, R.; VILLALOBOS, I.; de CHACON; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999. Jun;73(6):4738-47. PubMed PMID: 10233934.

LI, M. I.; WONG, P.S.J.; CHING NG, L.; TAN, C.H. Oral Susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, p. e1792, 28 ago. 2012.

LIANG, G.; GAO X.; GOULD, E.A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* 4:e18. 2015. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.18>.

LIBRATY, D.H.; PICHYANGKUL, S.; AJARIYAKHAJORN, C.; ENDY, T.P.; ENNIS, F.A.. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol.* 2001 Apr; 75(8):3501-8.

LIM, D. S.; YAWATA, N.; SELVA, K.J.; LI, N.; TSAI, C.Y.; YEONG, L.H.; LIONG, K.H.; OOI, E.E.; CHONG, M.K.; NG, M.L. LEO, Y.S.; YAWATA, M.; WONG, S.B. The combination of type I IFN, TNF-alpha, and cell surface receptor engagement with dendritic cells enables NK cells to overcome immune evasion by dengue virus. *J Immunol*, v. 193, n. 10, p. 5065-75, Nov 15 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic)0022-1767 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320280> >.

LIM, S.P. Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antiviral Res.* 2019 Mar;163:156-178. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.12.016. Epub 2018 Dec 29.

LIN, C. F., Wan, S. W., Chen, M. C.; LIN, S.C.; CHENG, C.C.; CHIU, S.C.; HSIAO, Y.L.; LEI, H. Y.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; LIN, Y.S. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest.* 88(10):1079-89. 2008.

LIN, C. F.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, C.C.; LIU, H. S.; YEH, T.M.; CHEN, S.H.; LIN, Y.S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol.* 69(1):82-90. 2003.

LIN, Y. S.; YEH, T. M.; LIN, C. F.; WAN, S. W.; CHUANG, Y. C.; HSU, T. K.; LIU, H. S.; LIU, C. C.; ANDERSON, R. and LEI, H. Y. "Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis." *Exp Biol Med (Maywood)* 236(5): 515-523. 2011.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research.* 59: 23-61. 2003.

LINDSAY, S.W.; WILSON, A.; GOLDING, N.; SCOTT, T.W.; TAKKEN, W. Improving the built environment in urban areas to control Aedes aegypti-borne diseases. *Bull World Health Organ.* 2017; 95(8): 607–608. pmid:28804174.

LIU, Q.; HAO, C. Y.; SU, P; SHI, J. H. Down-regulation of HLA class I antigen-processing machinery components in esophageal squamous cell carcinomas: Association with disease progression. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44, 960-969, 2009.

LIU, I. J.; CHIU, C. Y.; CHEN, Y. C. and WU, H. C. "Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus." *J Biol Chem* 286(11): 9726-9736. 2011.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. In Search of the Missing Self - Mhc Molecules and Nk Cell Recognition. *Immunol Today*, 11, 237-244, 1990.

LOGBIS, M.; BLANDEN, R.V.; MULLBACHER, A. Flavivirus-induced up-regulation of MHC class I antigens; implications for the induction of CD8+ T-cell-mediated autoimmunity. *Immunol Rev.* 1996 Aug;152:5-19. PubMed PMID: 8930665.

LOGBIS, M.; MULLBACHER, A.; LEE, E. Evidence that a Mechanism for Efficient Flavivirus Budding Upregulates MHC Class I. *Immunol Cell Biol.* 2004 Apr;82(2):184-8. PubMed PMID: 15061772.

LONG, E.O.; KIM, H.S.; LIU, D.; PETERSON, M.E.; RAJAGOPALAN, S. Controlling natural killer cell responses integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*, v. 31, p. 227-58, 2013. ISSN 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516982>>.

LUM, F.M.; LEE, D.; CHUA, T.K.; TAN, J.J.L.; LEE, C.Y.P.; LIU, X.; FANG, Y.; LEE, B.; YEE, W.X.; RICKETT, N.Y.; CHIA, P.Y.; LIM, V.; LEO, Y.S.; MATTHEWS, D.A.; HISCOX, J.A.; NG, L.F.P.. Zika Virus Infection Preferentially Counterbalances Human Peripheral Monocyte and/or NK Cell Activity. *mSphere*. 2018 Mar 28;3(2). pii: e00120-18. doi: 10.1128/mSphereDirect.00120-18. eCollection 2018 Mar-Apr.

LUM, F.M.; LIN, C.; SUSOVA, O.Y.; TEO, T.H.; FONG, S.W.; MAK, T.M.; LEE, L.K.; CHONG, C.Y.; LYE, D.C.B.; LIN, R.T.P.; MERITS, A.; LEO, Y.S.; NG, L.F.P.. Sensitive detection of Zika virus antigen in patients' whole blood as an alternative diagnostic approach. *J Infect Dis* 216:182–190. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix276>. 2017.

LUM, F.M.; LOW, D.K.; FAN, Y.; TAN, J.J.; LEE, B.; CHAN, J.K.; RÉNIA, L.; GINHOUX, F.; NG, L.F. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin Infect Dis* 64:914 –920. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw878>. 2017.

MACE, E. M., WU, W. W., HO, T., MANN, S. S., HSU, H. T. & ORANGE, J. S. NK Cell Lytic Granules Are Highly Motile at the Immunological Synapse and Require F-Actin for Post-Degranulation Persistence. *Journal of immunology*, 189, 4870-4880. 2012.

MACNAMARA, F. Zika virus: A report on three cases of human infection during na epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 48, n. 2, p. 139–145, mar. 1954.

MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. T cell responses in dengue viral infections. *J Clin Virol.* 58(4):605-11. 2013. Review.

MANANGEESWARAN, M.; KIELCZEWSKI, J.L.; SEM, H.N.; XU, B.C.; IRELAND, D.D.C.; MCWILLIAMS, I.L.; CHAN, C.C.; CASPI, R.R.; VERTHELYI, D. ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions. *Emerg Microbes Infect.* 2018 May 25;7(1):96. doi: 10.1038/s41426-018-0096-z.

MANDAL, A. & VISWANATHAN, C.. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015 Jun;8(2):47-55. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.11.006. Epub 2014 Dec 27.

MANSUY, J.M.; DUTERTRE, M.; MENGELLE, C.; FOURCADE, C.; MARCHOU, B.; DELOBEL, P.; IZOPET, J.; MARTIN-BLONDEL, G. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious Diseases* 16: 405. 2016.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A.L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:300-13. PubMed PMID: 18837790. Epub 2008/10/08. eng.

MAYER, S.V.; TESH, R.B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop.* 2017; 166: 155–163. pmid:27876643).

MAVILIO, D.; LOMBARDO, G.; BENJAMIN, J.; KIM, D.; FOLLMAN, D.; MARCENARO, E.; O'SHEA, M.A.; KINTER, A.; KOVACS, C.; MORETTA, A.; FAUCI, A.S. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc.Natl Acad USA*, v. 102, n.8, p. 2886-91, Feb 22 2005. ISSN 0027-8424 (Print). 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699323> >.

MCINTYRE, K. W.; WELSH, R. M. Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J. Exp. Med.* Nov 1;164(5):1667-81). 1986.

MEHTA, V. K.; VERMA, R.; GARG, R. K.; MALHOTRA, H. S.; SHARMA, P. K.; JAIN, A.. Study of interleukin-6 and interleukin8 levels in patients with neurological manifestations of dengue, *Journal of Postgraduate Medicine*, vol. 63, no. 1, pp. 11–15, 2017.

MICHLMAYR, D.; ANDRADE, P.; GONZALEZ, K.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E..CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol.* 2017 Nov;2(11):1462-1470. doi: 10.1038/s41564-017-0035-0. Epub 2017 Oct 2.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 2004 Jan 22;427(6972):313-9.

MONGKOLSAPAYA, J., DEJNIRATTISAI, W.; XU, X.N.; VASANAWATHANA, S.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHAIRUNSRI, A.; SAWASDIVORN, S.; DUANGCHINDA, T.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S.; YENCHITSOMANUS, P.T.; MCMICHAEL, A.; MALASIT, P.; SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* Jul;9(7):921-7. PubMed PMID: 12808447. 2003.

MONGKOLSAPAYA, J.; DUANGCHINDA, T.; DEJNIRATTISAI, W.; VASANAWATHANA, S.; AVIRUTNAN, P.; JAIRUNGSRI, A.; KHEMNU, N.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHOTIYARNWONG, P.; SAE-JANG, K.; KOCH, M.; JONES, Y.; MCMICHAEL, A.; XU, X.; MALASIT, P.; SCREATON, G. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* Mar 15;176(6):3821-9. PubMed PMID: 16517753. 2006.

MORETTA, A.; TAMBUSSI, G.; BOTTINO, C.; TRIPODI, G.; MERLI, A.; CICCONE, E.; PANTALEO, G.; MORETTA, L. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med.* 171(3):695-9. (Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19(3):354-8.). 1990.

MORETTA, L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood.* Nov 11;116(19):3689-91. doi: 10.1182/blood-2010-09-303057. 2010.

MORVAN, M.G.; LANIER, L.L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer.* 2016 Jan;16(1):7-19. doi: 10.1038/nrc.2015.5.

MUKHOPDHYAY, S., Kuhn, R. J. e Rossmann, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(1):13-22. 2005.

MULLBACHER, A. & LOBIGS, M.. Up-regulation of MHC class I by flavivirus-induced peptide translocation into the endoplasmic reticulum. *Immunity* 3(2), 207-214. 1995.

MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C.; BIERLAIRE, D.; ZISOU, K.; SHAN YAN, A.; CAO-LORMEAU, V.M.; BROULT, J.. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014 Apr 10;19(14). pii: 20761.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 10, p. 1887, out. 2015.

NAGATA, S.; SUDA, T. Fas and Fas Ligand - Lpr and Gld Mutations. *Immunol Today*, 16, 39-43. 1995.

- NARNI-MANCINELLI, E., VIVIER, E. & KERDILES, Y. M. 2011. The 'T-cell-ness' of NK cells: unexpected similarities between NK cells and T cells. *International immunology*, 23, 427-431. 2011.
- NASIRUDEEN, A. M.; WONG, H.H.; THIEN, P.; XU, S.; LAM, K.P.; LIU, D.X. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 1, p. e926, Jan 04 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245912> >.
- NATUK, R. J.; WELSH, R. M. Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at site of virus replication. *J. Immunol.* 138: 877. 1987.
- NITTA, T.; YAGITA, H.; SATO, KIYOSHI; OKUMURA, A.K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural-killer–target-cell interaction. *J. Exp. Med.* 170, 1757–1761. 1989.
- NUNES, P.C.G.; SAMPAIO, S.A.F.; RODRIGUES, C.N.; MENDONÇA, M.C.L.; LIMA, M.R.Q; ARAÚJO, S.E.M.; SANTOS, F.B.; SIMÕES, J.B.S.; SANTOS, G.B.; NOGUEIRA, R.M.R.; FILIPPIS, A.M.B. Gravidade da dengue associada à idade e nova linhagem do vírus da dengue Tipo 2 durante um surto no Rio de Janeiro, Brasil. *Journal of Medical Virology* 88: 1130–1136). 2016.
- OLIVEIRA MELO, A. S.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P.O.; ALVES SAMPAIO, S.; BISPO DE FILIPPIS, A.M. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.
- OLIVEIRA, E.R.A.; MOHANA-BORGES, R.; DE ALENCASTRO, R.B.; HORTA, B.A.C. The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 2017 Jan 2;227:115-123. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.005. Epub 2016 Oct 14.
- OLSON, J. G. KSIAZEK, T.G.; SUHANDIMAN; TRIWIBOWO. 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. 389–393, jan. 1981.
- O.M.S. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland: OMS press; 2009. Disponível em <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis>>.
- ORANGE, J.S.. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect.* 4:1545–58. 2002.
- OSINSKA, I.; POPKP, K.; DEMKOM, U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol.* 2014;39(1):109-15. doi: 10.5114/ceji.2014.42135. Epub 2014 Apr 17.

O'SULLIVAN, T.E.; SUN, J.C.; LANIER, L.L.. Natural killer cell memory. *Immunity* 43, 634–645. 2015.

OWEN, R.E.; YAMADA, E.; THOMPSON, C.I.; PHILLIPSON, L.J.; THOMPSON, C.; TAYLOR, E.; ZAMBON, M.; OSBORN, H.M.I.; BARCLAY, W.S.; BORROW, P. Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells. *J Virol.* 2007 Oct;81(20):11170-8. PubMed PMID: 17670834. Pubmed Central PMCID: 2045558).

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L.. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534. 1989.

PATRO, A.R.K.; MOHANTY, S.; PRUSTY, B.K.; SINGH, D.K.; GAIKWAD, S.; SASWAT, T.; CHATTOPADHYAY, S.; DAS, B.K.; TRIPATHY, R.; RAVINDRAN, B.. Cytokine Signature Associated with Disease Severity in Dengue. *Viruses.* 2019 Jan 8;11(1). pii: E34. doi: 10.3390/v11010034.

PAUL, L.; CARLIN, E.; JENKINS, M.; TAN, A.L.; BARCELLONA, C. M.; NICHOLSON, C. O.; MICHAEL, S. F.; ISERN, S. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. Florida Gulf Coast University, ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. Disponível em: <<http://biorxiv.org/content/early/2016/04/25/050112>>. Acessado 25 Abril 2016.

PAUPY, C.; DELATTE, H.; BAGNY, L.; CORBEL, V.; FONTENILLE, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 14, p. 1177–1185, 2009.

PAVALKO, F.M.; WALKER, D.M.; GRAHAM, L.; GOHEEN, M.. DOERSCHUK, C.M.; KANSAS, G.S.. The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. *J Cell Biol* 129: 1155–1164. 1995.

PAWLOWSKI, N.A.; ABRAHAM, E.L.; PONTIER, S.; SCOTT, W.A.; COHN, Z.A.. Human monocyte-endothelial cell interaction in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8208–8212. 1985.

PIETRA, G., MANZINI, C., RIVARA, S., VITALE, M., CANTONI, C., PETRETTO, A., BALSAMO, M., CONTE, R., BENELLI, R., MINGHELLI, S., SOLARI, N., GUALCO, M., QUEIROLO, P., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer research*, 72, 1407-1415. 2012.

POGGI, A.; CAROSIO, R.; SPAGGIARI, G.M.; FORTIS, C.; TAMBUSSI, G.; DELL'ANTONIO, G.; DAL CIN, E.; RUBARTELLI, A.; ZOCCHI, M.R. NK cell activation by dendritic cells is dependent on LFA-1-mediated induction of calcium-calmodulin kinase II: inhibition by HIV-1 Tat C-terminal domain. *J Immunol.* 2002 Jan 1;168(1):95-101. PubMed PMID: 11751951).

POLI, A.; MICHEL, T.; THERESINE, M.; ANDRES, E.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, v. 126, n. 4, p. 458-65, Apr 2009. ISSN 1365-2567 (Electronic) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278419> >.

PÓVOA, T. F.; ALVES, A. M.; OLIVEIRA, C. A. B.; NUOVO, G.J.; VERA, CHAGAS, V.L.A.; PAES, M.V. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. 9(4):e83386. 2014.

PRISANT, N.; BUJAN, L.; BENICHO, H.; HAYOT, P. H.; PAVILI, L.; LUREL S.; HERRMANN, C.; JANKY, E.; JOGUET, G. Zika virus in the female genital tract. *The Lancet Infectious Diseases* 16: 1000–1001. 2016.

RATHAKRISHNAN, A.; WANG, S.M.; HU, Y.; KHAN, A.M.; PONNAMPALAVANAR, S.; LC, L.U.M.; MANIKAM, R.; SEKARAN, S.D.. Perfil de expressão de citocinas em pacientes com dengue em diferentes fases da doença. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e52215. doi: 10.1371 / journal.pone.0052215. Epub 2012 20 de dezembro.

REEVES, E.; JAMES, E.. Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology*. 2017 Jan;150(1):16-24. doi: 10.1111/imm.12675. Epub 2016 Oct 12.

REVILLEZA, M. J., WANG, R., MANS, J., HONG, M. Q., NATARAJAN, K. & MARGULIES, D. H. How the Virus Outsmarts the Host: Function and Structure of Cytomegalovirus MHC-I-Like Molecules in the Evasion of Natural Killer Cell Surveillance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 724607. 2011.

RIOS, M.; ZHANG, M.J.; GRINEV, A.; SRINIVASAN, K.; DANIEL, S.; WOOD, O.; HEWLETT, I.K.; DAYTON, Al. Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. *Transfusion*. 46:659–667. 2006.

RODRIGUEZ-ROCHE, R; GOULD, E. A. Understanding the dengue viroses and progress towards their control. *BioMed research international*. 2013:690835. Pubmed PMID:23926822. Pubmed Central PMCID: 3722981.

ROIZ, D.; WILSON, A.L.; SCOTT, T.W.; FONSECA, D.M.; JOURDAIN, F.; MÜLLER, P.; VELAYUDHAN, R.; CORBEL, V. Integrated Aedes management for the control of Aedes-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Dec 6;12(12): e0006845. doi: 10.1371/journal.pntd.0006845. eCollection 2018 Dec.

ROMAGNANI, C.; JUELKE, K.; FALCO, M.; MORANDI, B.; D'AGOSTINO, A.; COSTA, R.; RATTO, G.; FORTE, G.; CARREGAS, P.; LUI, G.; CONTE, R.; STROWIG, T.; MORETTA, A.; MÜNZ, C.; THIEL, A.; MORETTA, L.; FERLAZZO, G.. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4947-55.

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

SAITO, M.; OISHI, K.; INOUE, S.; DIMAANO, E.M.; ALERA, M.T.; ROBLES, A. M.; ESTRELLA, B. D. JR.; HUMATORI, A.; MOJI, K.; ALONZO, M.T.; BUERANO, C.C.; MATIAS, R.R.; MORITA, K.; NATIVIDAD, F.F.; NAGATAKE, T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol.* 138(2):299-303. 2004.

SALINAS, S.; SCHIAVO, G.; KREMER, E.J.. A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol.* 8:645–655. 2010.

SANGKAWIBHA, N.; ROJANASUPHOT, S.; AHANDRIK, S.; VIRIYAPONGSE, S.; JATANASEN, S.; SALITUL, V.; PHANTHUMACHINDA, B.; HALSTEAD, S.B. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653–669. 1984.

SANTOS, L. Características Clínicas, Epidemiológicas e Perfil de Citocinas em Pacientes Naturalmente Infectados pelo Dengue, Zika ou Coinfectados durante a Epidemia de 2016, Mato Grosso Do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

SCOVILLE, S.D.; FREUD, A.G.; CALIGIURI, M.A.. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. *Front Immunol.* 2017. 8:360. doi:10.3389/fimmu.2017.00360.

SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E.A.; HALASA, Y.A.; STANAWAY, J.D.. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 16 (2016), pp. 935-941.

SHI, J., TRICOT, G. J., GARG, T. K., MALAVIARACHCHI, P. A., SZMANIA, S. M., KELLUM, R. E., STORRIE, B., MULDER, A., SHAUGHNESSY, J. D., BARLOGIE, B.; VAN RHEE, F. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*, 111, 1309-1317, 2008.

SIMMONS, C.P.; FARRAR, J. J.; NGUYEN v, V. and WILLS, B. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 366, 1423-1432. 2012.

SIVORI, S.; FALCO, M.; DELLA CHIESA, M.; CARTOMAGNO, S.; VITABE, M.; MORETTA, L.; MORETTA, A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, n. 27, p. 10116-21. Jul 06 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218108> >.

SLOBEDMAN, B.; BARRY, P.A.; SPENCER, J.V.; AVDIC, S.; ABENDROTH, A. Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol*. 2009 ct;83(19):9618-29. PubMed PMID: 19640997. Pubmed Central PMCID: 2747999.

SMITH, W.; TOMASEC, P.; AICHELER, R.; LOEWENDORF, A.; NEMCOVICOVA, .; WANG, E.C.; STANTON, R.J.; MACAULEY, M.; NORRIS, P.; WILLEN, L.; RUCKOVA, E.; NOMOTO, A.; SCHNEIDER, P.; HAHN, G.; ZAJONC, D.M.; WARE, C.F.; WILKINSON, G.W.; BENEDICT, C.A.; Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses. *Cell Host Microbe*. 2013 Mar 13;13(3):324-35. PubMed PMID: 23498957. Pubmed Central PMCID: 3601332.

SONG, B.H.; YUN, S.I.; WOOLLEY, M.; LEE, Y.M.. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol*. Jul 15;308:50-64. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.001. Epub 2017 Mar 3. 2017.

SOUZA, B.M.B.; DE VITO, F.B.; CALADO, M.L.; SILVA, M.V.; OLIVEIRA, L.R.; RODRIGUES-JÚNIOR, V.; MORAES-SOUZA, H.. Evaluation of the cytotoxic response mediated by perforin and granzyme B in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2018 Jan;59(1):214-220. doi: 10.1080/10428194.2017.1341978. Epub 2017, Jul 6.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol*. 57:827. 1995.

STADNISKY, M. D., XIE, X., COATS, E. R., BULLOCK, T. N. & BROWN, M. G. Self MHC class I-licensed NK cells enhance adaptive CD8 T-cell viral immunity. *Blood*, 117, 5133-5141. 2011.

STEFANIK, M.; FORMANOVA, P.; BILY, T.; VANCOVA, M.; EYER, L.; PALUS, M.; SALAT, J.; BRACONI, C.T.; ZANOTTO, P.M.A.; GOULD, E.A.; RUZEK, D.. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neurosci*. 2018 Feb 20;19(1):5. doi: 10.1186/s12868-018-0407-2.

STRAUSS-ALBEE, D.M.; HOROWITZ, A.; PARHAM, P.; BLISH, C.A.. Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system. *J. Immunol*. 193, 4871–4879. 2014.

SUBISSI, L.; DUB, T.; BESNARD, M.; MARITERAGI-HELLE, T.; NHAN, T.; LUTRINGER-MAGNIN, D.; BARBOZA, P.; GURRY, C.; BRINDEL, P.; NILLES, E.J.; BAUD, D.; MERIANOS, A.; MUSSO, D.; GLYNN, J.R.; DUPUIS, G.; CAO-LORMEAU, V.M.; GIARD, M.; MALLET, H.P.. Zika Virus Infection during Pregnancy and Effects on Early Childhood Development, French Polynesia, 2013-2016. *Emerg Infect Dis.* 2018 Oct;24(10):1850-1858. doi: 10.3201/eid2410.172079.

SUKHRALIA, S.; VERMA, M.; GOPIRAJAN, S.; DHANARAJ, P.S.; LAL, R.; MEHLA, N.; KANT, C.R.. From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Jan;38(1):3-14. doi: 10.1007/s10096-018-3375-7. Epub 2018 Sep 28. 2019.

SUN, J.C.; LANIER, L.L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:645–657.

SUZUKI, N.; SUZUKI, T.; ENGLEMAN, E. G. Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 173, 1451–1461. 1991.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140(6): 805-820. 2010.

TALARICO, L.B.; BYRNE, A.B.; AMARILLA, S.; LOVERA, D.; VÁZQUEZ, C.; CHAMORRO, G.; ACOSTA, P. L.; FERRETTI, A.; CABALLERO, M.T.; ARBO, A.; POLACK, F.P.. Characterization of type I interferon responses in dengue and severe dengue in children in Paraguay. *J Clin Virol.* 2017 Dec;97:10-17. doi: 10.1016/j.jcv.2017.10.010. Epub 2017 Oct 18.

TALAVERA, D.; CASTILLO, A.M.; DOMINGUEZ, M.C.; GUTIERREZ, A.E.; MEZA, I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *Journal of General Virology* 85: 1801–1813. 2004.

TESI, B.; SCHLUMS, H.; CICHOCKI, F.; BRYCESON, Y.T. Epigenetic regulation of adaptive NK cell diversification. *Trends Immunol.* 37, 451–461. 2016.

THEPPARIT, C.; KHAKPOOR, A.; KHONGWICHIT, S.; WIKAN, N.; FONGSRAN, C.; CHINGSUWANROTE, P.; PANRAKSA, P.; SMITH, D.R. Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes.* 2013 Sep 14;6:372. doi: 10.1186/1756-0500-6-372.

THOREN, F. B.; ROMERO, A. I.; HERMODSSON, S.; HELLSTRAND, K.. The CD16-/CD56bright subset of NK cells is resistant to oxidant-induced cell death. *Journal of immunology*, 179, 781-785. 2007.

TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C.P.; FARRAR, J; MARTIN, T.R.; KATZE, M.G. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(1):16-32. 2012. (Review).

TORRENTES-CARVALHO, A.; AZEREDO, E.L.; REIS, S.R.; MIRANDA, A.S.; GANDINI, M.; BARBOSA, L.S.; KUBELKA, C.F.. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Dec;104(8):1091-9.

TORRES, S.; HERNANDEZ, J.C.; GIRALDO, D.; ARBOLEDA, M.; ROJAS, M.; SMIT, J.M.; URCUQUI-INCHIMA, S. Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 7, n. 2, p. e2060, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469297> >.

TORTORELLA, D.; GEWURZ, B.E.; FURMAN, M.H.; SCHUST, D.J.; PLOEGH, H.L. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:861-926. PubMed PMID: 10837078.

TSAI, Y.T.; CHANG, S.Y.; LEE, C.N.; KAO, C.L.. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol.* v. 11, n. 4, p. 604-15, Apr 2009. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19134117> >.

VAN DER POLL, T.; KEOGH, C.V.; GUIRAO, X.; BUURMAN, W.A.; KOPF, M.; LOWRY, S.F.. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 1997 Aug; 176(2):439-44.

VAN DER SCHAAR, H.M.; RUST, M.J.; CHEN, C.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J.; ZHUANG, X; SMIT, J.M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* Dec;4(12): e1000244. 2008. PubMed PMID: 19096510. Pubmed Central PMCID: 2592694.

VAUGHN, D.W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):2-9. PubMed PMID: 10608744.

VIEIRA MACHADO, A.A.; ESTEVAN, A.O.; SALES, A.; BRABES KC, D. S.; CRODA, J.; NEGRAO, F.J.. Direct costs of dengue hospitalization in Brazil: public and private health care systems and use of WHO guidelines. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Sep;8(9):e3104.

VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S.; Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):503-10. doi: 10.1038/ni1582.

VIVIER, E., RAULET, D. H., MORETTA, A., CALIGIURI, M. A., ZITVOGEL, L., LANIER, L. L., YOKOYAMA, W. M. & UGOLINI, S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331, 44-49. 2011.

VOSKOBOINIK, I.; SMYTH, M. J.; TRAPANI, J. A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Rev. Immunol.* 6, 940–952 2006.

XU, L.; CHEN, D.; LU, C.; LIU, X.; WU, G.; ZHANG, Y.. Advanced lung cancer is associated with decreased expression of perforin, CD95, CD38 by circulating CD3+ CD8+ T lymphocytes. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45:528–532.

WAHID, S. F; SANUSI, S.; ZAWAWI, M.M.; ALI, R.A. A comparison of the pattern of liver involvement in dengue hemorrhagic fever with classic dengue fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 31, n. 2, p. 259-63, Jun 2000. ISSN 0125-1562 (Print) 0125-1562 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11127322> >.

WALDHAUER, I.; STEINLE, A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*, 27, 5932-5943, 2008.

WALZER, T.; DALOD, M.; VIVIER, E.; ZITVOGEL, L.. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Sep;5 Suppl 1:S49-59.

WAN, S. W.; LIN, C. F.; YEH, T. M.; LIU, C. C.; LIU, H. S.; WANG, S.; LING, P. Ling; ANDERSON, R.; LEI, H. Y. and LIN, Y. S. "Autoimmunity in dengue pathogenesis." *J Formos Med Assoc* 112(1): 3-11. 2013.

WANG, Y.; ZHANG, P.. Recent advances in the identification of the host factors involved in dengue virus replication. *Virology*. 2017 Feb;32(1):23-31. doi: 10.1007/s12250-016-3902-6. Epub 2017 Jan 24.

WANG, W.K.; SUNG, T.L.; TSAI, Y.C.; KAO, C.L.; CHANG, S.M.; KING, C.C. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.*;40:4472–4478. 2002.

WANG, W.; ERBE, A.K.; HANK, J.A.; MORRIS, Z.S.; SONDEL, P.M.. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015 Jul 27;6:368. doi: 10.3389/fimmu.2015.00368. eCollection 2015.

WATI, S.; RAWLINSON, S. M.; IVANOV, R. A.; DORSTYN, L.; BARBA, M.R.; JANS, D.A.; PITSON, S.M.; BURRELL, C.J.; LI, P.; CARR, J.M.. Tumour necrosis factor alpha (TNF α) stimulation of cells with established dengue virus type 2 infection induces cell death that is accompanied by a reduced ability of TNF- α to activate nuclear factor κ B and reduced sphingosine kinase-1 activity. *Journal of general virology*, v. 92, n. 4, p. 807-818, 2011.

WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; PUTYATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C.G., HALSTEAD, S.B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. Oct 23;354(9188):1431-4. 1999. PubMed PMID: 10543670.

WEISKOPF, D.; SETTE, A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Front Immunol*. 5:93. 2014.

WHO. Dengue haemorrhagic fever Diagnosis, treatment, prevention and control, 1997. Disponível em:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41988/9241545003_eng.pdf;jsessionid=2DB127449FF6AA9F59BC02C1ADD16839?sequence=1

WHO. Zika virus outbreaks in the Americas. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; 90:609–10.

WONG, K.L.; YEAP, W.H.; TAI, J.J.; ONG, S.M.; DANG, T.M.; WONG, S.C.. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012 Sep;53(1-3):41-57. doi: 10.1007/s12026-012-8297-3.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 15–17, 2017.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D.J.; WEAVER, S.C.; MONATH, T.P.; HEYMANN, D.L.; SCOTT, T.W. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(3): e101–e106. PMID:28011234.

WONG KL, TAI JJ, WONG WC, HAN H, SEM X, YEAP WH, KOURILSKY P, WONG SC. Gene expression. profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011; 118:e16–31. [PubMed: 21653326].

YACOUB, S.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Jun;26(3):284-9. doi: 10.1097/QCO.0b013e32835fb938.

YE, J.; ZHU, B.; FU, Z.F.; CHEN, H.; CAO, S.; Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*. (2013) 31:461–71. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.015.

YOON, S. R.; CHUNG, J. W.; CHOI, I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Molecules and cells*, 24, 1-8, 2007.

YOSSEF, R.; ROSENTAL, B.; APPEL, M.Y.; HERSHKOVITZ, O.; PORGADOR, A.. Upregulation of MHC class I expression following dengue virus infection: the mechanism at the promoter level. *ExpertRevAntilInfectTher* (2012) 10:285–7. doi:10.1586/eri.12.7.

YU, J. H.; MAO, H. Y. C.; WEI, M.; HUGHES, T.; ZHANG, J. Y.; PARK, I. K.; LIU, S. J.; MCCLORY, S.; MARCUCCI, G.; TROTTA, R.; CALIGIURI, M. A.. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56(bright) and CD56(dim) human NK-cell subsets. *Blood*, 115, 274-281. 2010.

ZANLUCA, C; ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. DE; MOSIMANN, A.L. P.; SANTOS, G. I. DOS; SANTOS, C.N. DOS; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–72, jun. 2015.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):603-6.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; DALOD, M.; GRAU, V.; HART, D.N.; LEENEN, P.J.; LIU, Y.J.; MACPHERSON, G.; RANDOLPH, G.J.; SCHERBERICH, J.; SCHMITZ, J.; SHORTMAN, K.; SOZZANI, S.; STROBL, H.; ZEMBALA, M.; AUSTYN, J.M.; LUTZ, M.B.. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. Epub 2010 Jul 13.

ZWIRNER, N.W.; DOMAICA, C.I. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors*. v. 36, n. 4, p. 274-88, Jul-Aug 2010. ISSN 1872-8081 (Electronic) 0951-6433 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20623510> >.