

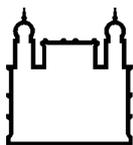
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDO DOS PERFIS INFLAMATÓRIO E CITOTÓXICO DE  
LINFÓCITOS T DE MULHERES EXPOSTAS AO VÍRUS ZIKA  
DURANTE GESTAÇÃO: IMPACTO DA MODULAÇÃO DOS  
RECEPTORES CCR5 E CX3CR1 NA RESPOSTA DAS CÉLULAS T

DÉBORA FAMILIAR RODRIGUES MACEDO

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Débora Familiar Rodrigues Macedo*

Estudo dos perfis inflamatório e citotóxico de linfócitos T de mulheres expostas ao vírus zika durante gestação: impacto da modulação dos receptores CCR5 e CX3CR1 na resposta das células T

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

**Orientadora:** Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2019

Macedo, Débora Familiar Rodrigues.

Estudo dos perfis inflamatório e citotóxico de linfócitos T de mulheres expostas ao vírus zika durante gestação: Impacto da modulação dos receptores CCR5 e CX3CR1 na resposta das células T / Débora Familiar Rodrigues Macedo. - Rio de Janeiro, 2019.

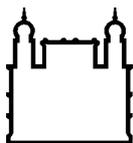
xviii, 97f f.; il.

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

Orientadora: Luzia Maria de Oliveira Pinto.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Vírus Zika. 2. Gravidez. 3. Receptores de quimiocinas. 4. Linfócito T .  
5. Resposta imune. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: DÉBORA FAMILIAR RODRIGUES MACEDO***

**Estudo dos perfis inflamatório e citotóxico de linfócitos T de mulheres  
expostas ao vírus zika durante gestação: impacto da modulação dos  
receptores CCR5 e CX3CR1 na resposta das células T**

**ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto**

**Aprovada em: 19/12/2019**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira- Presidente**

IOC/FIOCRUZ

**Prof. Dra. Joanna Reis Santos de Oliveira**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

**Prof. Dra. Elen Mello de Souza**

IOC/FIOCRUZ

**Prof. Dra. Veronica Schmitz Pereira**

IOC/FIOCRUZ (Suplente Interno)

**Prof. Dra. Luciana Souza de Paiva**

Universidade Federal Fluminense (UFF) (Suplente externo)

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2019

Dedico essa dissertação a todas as  
supermães que fizeram possível  
esse projeto e a todos que  
colaboram.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a todas as famílias integrantes deste projeto. Supermães que amam, protegem, cuidam de seus filhos e ainda se preocupam com o futuro de outras crianças que possam a vir passar pela mesma situação que seus filhos. Vocês são exemplos de força, superação e de amor ao próximo. Sem vocês, a ciência teria muito mais lacunas a preencher e eu não teria tido a oportunidade de aprender tanto com vocês. Muito obrigada pelo esforço que vocês fazem para um bem maior e por terem me ensinado tanto.

Além das supermães incluídas neste projeto, eu tenho muito a agradecer a minha orientadora, Luzia. Muito obrigada por ter aberto as portas para mim mesmo sabendo de toda a luta que viria pela frente. Eu acabei decidindo deixar um pouco a biologia molecular e me “aventurar” pela imunologia e você abraçou o sonho de uma aluna e tornou seu. Agradeço muito por todos os minutos que você abriu mão de fazer outras coisas para me ensinar e me guiar da melhor forma possível, sem você eu não teria conseguido passar por todos os desafios. Agradeço pelas palavras dóceis que me consolavam nos momentos que eu me desesperava e pelas puxadas de orelha que me fizeram crescer profissionalmente. Muito obrigada por ser essa profissional maravilhosa que estimula, cobra e se doa muito pela causa. Espero um dia conseguir ser um pouco desse profissional que você é e deixar você orgulhosa por ter sido sua aluna.

Aos queridos integrantes do Laboratório de imunologia viral, em especial aos queridos Iury Paiva e Jéssica Badolato. Agradeço todo dia por vocês terem existido na minha trajetória, sem vocês esse projeto não teria sido a mesma coisa. Muito obrigada por todos os ensinamentos, conversas, risadas, muito companheirismo e por aturarem minhas inseguranças e reclamações (haha). Vocês sempre foram maravilhosos comigo desde o primeiro momento, a cada segundo se dispuseram a me ensinar tudo que vocês sabiam com a maior das paciências, não existem palavras suficientes pra expressar a minha gratidão. Muito muito obrigada! Quero vocês para sempre na minha vida! Queria agradecer também a Priscila Nunes, Alex Pauvolid, Thiara Manuele e Monique Lima por todos os ensinamentos passados, por toda paciência, dedicação e bons

momentos vividos juntos. As queridas Caroline Fernandes e Raquel Lima, entramos juntas nessa aventura e a amizade de vocês ajudou a seguir até o fim! Foi muito bom saber que tinha vocês ali vivendo as mesmas coisas que eu, e que poderia contar com vocês pra desabafar, pra brincar e pra compartilhar momentos bons também. A volta pra casa sempre foi mais divertida quando estávamos juntas rindo ou reclamando da vida.

Gostaria de agradecer a equipe maravilhosa do LAMAP-UFF, principalmente a Fabiana Rabe e a Dra. Claudete por acreditarem na gente e por toda ajuda para tornar possível esse e outros projetos! Equipe como essa não se encontra em todos os lugares.

Agradecer as queridas amigas do Ciência sem Fronteiras, Jéssica, Manoela e Raíssa, pela enorme amizade mesmo que a distância. Muito obrigada por estarem sempre presentes, curtindo junto comigo cada passado dado em direção aos meus sonhos, obrigada por me escutarem, por me darem conselhos e por compartilharem comigo a vida de vocês. Já se passaram 5 anos do CSF e essa amizade só se fortalece cada vez mais. Muito obrigada, lindas!

Agradecer as amigas de longa data da UFF, Fernanda Bottino, Erika Costa, Tatiana Xavier e a Rita Cubel. Levo muito de cada uma de vocês no meu dia a dia. Obrigada por todos os papos, incentivos e pela indicação a esse Laboratório, sem vocês eu teria desistido há muito tempo da vida acadêmica. Obrigada pela amizade repleta de carinho!

Queria agradecer aos meus queridos amigos da BioUFF, Mariana Cavalcante, André Vinícius e Alice Sampaio. Vocês são amigos incríveis sempre presentes na minha vida, que estiveram alí nos momentos difíceis e nos momentos mais felizes da minha vida! O apoio de vocês sempre foi essencial mesmo que a gente demore tanto pra se encontrar hahah. Obrigada pela amizade incondicional.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais, por todo esforço e dedicação dados a minha criação e educação ao longo da minha vida. Sei o quanto vocês abriram mão para me dar o melhor possível. Muito obrigada por estarem sempre presentes em cada momento da minha vida e por me apoiarem a seguir meus sonhos mais loucos. Não sei o que seria de mim sem vocês! Obrigada por todo

amor e carinho e por cuidarem tão bem de mim mesmo depois de velha e casada. Agradecer ao meu irmão e minha cunhada que sempre foram meus ídolos e que já me ajudaram muito, ajudaram a passar no vestibular, ajudaram nas matérias da faculdade (nem sei como passei em cálculo até hoje, milagre de vocês) e por me ajudarem no dia a dia, sempre me apoiando e estando presente na minha vida. E não poderia faltar agradecimento a minha avó amada Lecilda (*in memorian*) que me faz muita falta, mas que eu tenho a certeza que está comigo todos os dias me protegendo, me guiando e vibrando com as minhas vitórias. Como eu queria sua presença aqui nesse ano de 2019. Vocês são meus maiores exemplos, meus pilares, meu porto seguro, meu tudo. Obrigada por tudo! Amo vocês demais!

Agradecer ao meu amado e maravilhoso marido, Pery. Nos conhecemos eu era bem jovem e seguimos juntos esses 10 anos apoiando um ao outro. Agradeço muito por todo amor, dedicação, paciência e por toda ajuda para chegar até aqui. Obrigada pelo seu apoio incondicional e por todo o incentivo nos momentos que eu queria desistir. Eu não consigo imaginar uma vida sem você. E pra você, deixo uma mensagem dita por um dos seus cientistas favorito: *“Dada a vastidão do espaço e na imensidão do tempo, é uma alegria poder compartilhar um planeta e uma época com você”*. Carl sagan.

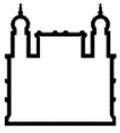
A plataforma de citometria de fluxo da FIOCRUZ, em especial a Mariana Gandini e a Tábata, sempre presentes nos salvando nos momentos de desespero.

À Pós-graduação em Biologia Parasitária;

A banca avaliadora por ter aceitado o convite com tanta gentileza e pelo tempo dedicado a tornar esse trabalho ainda melhor;

Aos suportes financeiros, CNPq, IOC/FIOCRUZ pelo auxílio a este projeto.

*L'unico modo per trovare la risposta è  
farsi seriamente la domanda (autor  
desconhecido)*



Ministério da Saúde

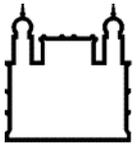
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Estudo dos perfis inflamatório e citotóxico de linfócitos T de mulheres expostas ao vírus zika durante gestação: impacto da modulação dos receptores CCR5 e CX3CR1 na resposta das células T

### RESUMO

Em 2015-2016, o vírus zika (ZIKV) foi o agente causador de um surto importante de zika no Brasil. A maioria dos indivíduos infectados pelo ZIKV são assintomáticos e naqueles sintomáticos, a doença é em geral branda e autolimitada. Mas, existem relatos de alterações neurológicas associadas ao ZIKV, como a síndrome de Guillain-Barré em adultos e a Síndrome Congênita do Zika (SCZ) em crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus na gravidez. Considerando-se que ZIKV e DENV compartilham em média 43% de identidade de aminoácidos nas 10 regiões da poliproteína viral e que, o surto de ZIKV se deu em regiões endêmicas do DENV, vários questionamentos vêm sendo levantados. Dentre eles, se existe uma imunidade cruzada entre ZIKV e DENV e qual a consequência disso no desfecho clínico do paciente. Neste estudo, pretendemos avaliar os perfis inflamatório e citotóxico dos linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória específicos ao ZIKV, associando a funcionalidade das células T à expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1. Para isso, vamos caracterizar a resposta dos linfócitos T de memória de mulheres que foram infectadas pelo ZIKV durante a gravidez em 2016-2017 na região Metropolitana II do RJ. As amostras de sangue foram coletadas dois ou três anos após a fase aguda da doença (2018-2019), para o estudo da memória imunológica ao ZIKV. Vinte e duas mães foram avaliadas e comparadas de acordo com o desfecho clínico de seus filhos: o 1º grupo foi constituído de mães que tem filhos assintomáticos (n=12) e o 2º grupo, mães com filhos que apresentam alterações características da SCZ (n=10). Utilizamos um conjunto de peptídeos derivados do ZIKV (*megapools* de ZIKV) restrito a ligação aos HLAs de classe I e II, portanto, indutores de resposta das células T CD8+ e CD4+. Esses *megapools* são representativos das 10 regiões da poliproteína viral consideradas imunogênicas e, foram definidos segundo percentuais de identidade de aminoácidos entre DENV e ZIKV. As PBMCs foram estimuladas *in vitro* com os *megapools* de ZIKV e analisadas no ensaio de EliSpot para detecção de células produtoras de IFN- $\gamma$ , detecção de IFN- $\gamma$  intracelular e avaliação da expressão da proteína de grânulo CD107a e dos receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 por citometria de fluxo. Por fim, ensaios de bloqueio dos CCR5 e CX3CR1 foram realizadas na tentativa de entender o papel desses receptores na funcionalidade das células. Nossos resultados indicam que independente do desfecho clínico da criança, mais de 60% das mulheres apresentam anticorpos IgG anti-DENV e IgG anti-ZIKV. Em relação a funcionalidade das células, é possível observar que mães de crianças assintomáticas apresentam maior tendência a magnitude de produção de IFN- $\gamma$ , assim como de frequência de respondedores comparado as mães de bebês com SCZ. No intuito de distinguir as respostas das CD4 e CD8, realizamos ensaio de citometria de fluxo. Observamos que os *megapools* de ZIKV nas células das mulheres com filhos assintomáticos, tendem a: induzir maior resposta das células T CD4+IFN- $\gamma$ +, menor resposta CD4+CD107a+, maior resposta CD4+CCR5+ e resposta similar das CD4+CX3CR1+ comparado as mães com filhos com SCZ. Já nas células T CD8+, os *megapools* de ZIKV induzem uma resposta similar das células T CD8+IFN- $\gamma$ + e CD8+CX3CR1+ específicas entre os grupos de mães, com uma frequência de respondedores muito baixa. Mas, a resposta das células T CD8+CD107a+ e das CD8+CCR5+ específicas foi maior nas mães com filhos com SCZ comparado àquelas com filhos assintomáticos. No geral, as células T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$  e que expressam CD107a são predominantemente CCR5+CX3CR1+ nos dois grupos de mães. Nos ensaios *in vitro*, parece que o bloqueio da expressão de CCR5 ou CX3CR1 não altera a produção de IFN- $\gamma$  nas células expostas ao ZIKV. Mas, os bloqueios interferem na atividade citotóxica das células TCD8+ quando expostas ao ZIKV e nas células T CD4+ quando expostas aos *megapools* de ZIKV. Assim, concluímos a imunidade ao DENV não teve uma influência importante no desfecho clínico de filhos expostos via transmissão vertical. Ainda, que um perfil mais inflamatório e menos citotóxico das células T CD4+ das mães pode ter influenciado no desfecho clínico mais branda de seus filhos. Mas, parece que a resposta inflamatória e citotóxica das células T CD8+ tem menos impacto na doença e no desfecho clínico dos bebês. Mais experimentos devem ser realizados sobre o efeito do bloqueio de CCR5 e CX3CR1 na funcionalidade das células T.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **Study of inflammatory and cytotoxic T lymphocyte profiles of Zika virus-exposed women during pregnancy: impact of CCR5 and CX3CR1 receptor modulation on T cell responses**

### **ABSTRACT**

In 2015-2016, Zika virus (ZIKV) was the causative agent of a major outbreak of Zika in Brazil. Most individuals infected with ZIKV are asymptomatic and in those symptomatic, the disease is usually mild and self-limiting. But there are reports of neurological changes associated with ZIKV, such as Guillain-Barré syndrome in adults and Congenital Zika Syndrome (CZS) in children born from mothers infected with the virus in pregnancy. Considering that ZIKV and DENV share on average 43% of amino acid identity in the 10 viral polyprotein regions and that the ZIKV outbreak occurred in endemic regions of DENV, several questions have been raised. Among them, if there is a cross immunity between ZIKV and DENV and what is the consequence on the patient's clinical outcome. The aim of this study is to evaluate the inflammatory and cytotoxic profiles of ZIKV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T lymphocytes by associating T cell functionality with CCR5 and CX3CR1 chemokine receptor expression. To this end, we will characterize the memory T-lymphocyte response of women who were infected with ZIKV during pregnancy in 2016-2017 in the Metropolitan Region II of RJ. Blood samples were collected two or three years after the acute phase of the disease (2018-2019) for the study of ZIKV immunological memory. Twenty-two mothers were assessed and compared according to their children's clinical outcome: the first group consisted of mothers with asymptomatic children (n= 12) and the second group mothers with children who had characteristic changes of CZS (n= 10). We used a set of ZIKV-derived peptides (ZIKV megapools) restricted to binding to class I and II HLAs, thus inducing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell response. These megapools are representative of the 10 regions of viral polyprotein considered immunogenic and were defined according to amino acid identity between DENV and ZIKV. PBMCs were stimulated *in vitro* with ZIKV megapools and analyzed in the EliSpot assay for detection of IFN- $\gamma$  producing cells, detection of intracellular IFN- $\gamma$ , and evaluation of CD107a granules protein expression and CCR5 and CX3CR1 chemokine receptors by flow cytometry. Finally, CCR5 and CX3CR1 blockade assays were performed to understand the role of these receptors in cell functionality. Our results indicate that regardless of the child's clinical outcome, more than 60% of women have anti-DENV IgG and anti-ZIKV IgG antibodies. Regarding the functionality of cells, it is possible to observe that mothers of asymptomatic children has greater tendency to the magnitude of IFN- $\gamma$  production, as well as the frequency of responders compared to mothers of babies with CZS. In order to distinguish CD4 and CD8 responses, we performed flow cytometry assay. We observed that ZIKV megapools in cells of women with asymptomatic children tend to: induce higher CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cell response, lower CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> response, higher CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> response and similar CD4<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> response compared to mothers with children with SCZ. In CD8<sup>+</sup> T cells, ZIKV megapools induce a similar response of specific CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> T cells between the mother groups, with a very low frequency of responders. But the response of CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> T cells and specific CD8<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> T cells was higher in mothers with children with SCZ compared to those with asymptomatic children. In general, IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD107a are predominantly CCR5<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> in both groups of mothers. In *in vitro* assays, it appears that blocking CCR5 or CX3CR1 expression does not alter IFN- $\gamma$  production in cells exposed to ZIKV. But blockages interfere with the cytotoxic activity of TCD8<sup>+</sup> cells when exposed to ZIKV and CD4<sup>+</sup> T cells when exposed to ZIKV megapools. Thus, we concluded that DENV immunity did not have an important influence on the clinical outcome of children exposed via vertical transmission. Moreover, that a more inflammatory and less cytotoxic profile of mothers' CD4<sup>+</sup> T cells may have influenced the milder clinical outcome of their children. But it appears that the inflammatory and cytotoxic response of CD8<sup>+</sup> T cells has less impact on the disease and clinical outcome of infants. Further experiments should be performed on the effect of CCR5 and CX3CR1 blockade on T-cell functionality.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>	
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>	
<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Histórico e Epidemiologia .....	1
1.2	Vírus zika.....	3
1.2.1	Classificação, características virais e seu genoma.....	3
1.2.2	Replicação viral do ZIKV e outros Flavivírus.....	7
1.2.3	Rotas de infecção.....	8
1.2.4	Manifestações clínicas.....	11
1.3	Imunopatogênese.....	13
1.3.1	Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE).....	14
1.3.2	Teoria do Pecado Antigênico Original e Tempestade de citocinas.....	16
1.4	Quimiocinas e seus receptores.....	19
1.4.1	Classificação e funcionalidade.....	19
1.4.2	O papel de CCL5, CX3CL1 e seus receptores nos Flavivirus.....	23
1.5	Justificativa.....	25
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>28</b>
2.1	Objetivo Geral .....	28
2.2	Objetivos Específicos .....	28
<b>3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1	Desenho Experimental.....	29
3.2	População de Estudo.....	29

3.3	Procedimentos Éticos.....	30
3.4	Separação de células mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) por gradiente de densidade.....	31
3.5	Ensaio de Imunoabsorção ligado a Enzima (ELISA) para Detecção de anticorpos IgG anti-DENV e anti-ZIKV.....	31
3.6	Caracterização do <i>pool</i> de peptídeos ( <i>Megapool</i> ) de ZIKV.....	32
3.7	Estimulação <i>in vitro</i> dos Linfócitos T com <i>Megapools</i> de ZIKV.....	33
3.8	Marcação extracelular e intracelular por citometria de fluxo.....	34
3.9	Ensaio de EliSpot para deteção de células produtoras de IFN- $\gamma$ .....	36
3.10	Ensaio de bloqueio com recombinantes das quimiocinas CCL5 e CX3CL1 e com anticorpos anti-CCL5 e anti-CX3CL1.....	37
3.11	Efeito do bloqueio da expressão de CCR5 e CX3CR1 na produção de IFN- $\gamma$ e expressão de CD107a após estimulação com o isolado de ZIKV ou <i>Megapools</i> .....	39
3.12	Manutenção da cultura de células VERO.....	40
3.13	Propagação do ZIKV.....	41
3.14	Extração de RNA do propagado do ZIKV nas células VERO utilizando o Kit QIAamp® VIRAL RNA.....	42
3.15	Detecção do RNA de ZIKV por PCR em tempo real.....	42
3.16	Titulação da massa viral por <i>Plaque Assay</i> .....	43
3.17	Análises Estatísticas.....	44
4	Resultados.....	45
4.1	<i>Dados clínicos dos pacientes infectados pelo ZIKV durante a gravidez</i> .....	45

4.2	<i>Detecção de anticorpo IgG anti-ZIKV nas mulheres convalescentes que foram infectadas durante a gravidez por ZIKV.....</i>	<i>47</i>
4.3	<i>Produção de IFN<math>\gamma</math> dos linfócitos T de indivíduos expostos ao ZIKV após estimulação in vitro com epítomos do ZIKV.....</i>	<i>49</i>
4.4	<i>Detecção de células T produtoras de IFN-<math>\gamma</math> específicas aos megapools de ZIKV pelo ensaio de marcação intracelular de citocinas (ICS).....</i>	<i>51</i>
4.5	<i>Avaliação da atividade citotóxica de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de mulheres expostas ao ZIKV.....</i>	<i>53</i>
4.6	<i>Expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 dos linfócitos T após estimulação in vitro com epítomos do ZIKV.....</i>	<i>55</i>
4.7	<i>Associação do perfil inflamatório e citotóxico de linfócitos T expressando CCR5 e/ou CX3CR1 após estimulação in vitro com epítomos do ZIKV.....</i>	<i>57</i>
4.8	<i>Avaliação da pureza e cálculo do título do ZIKV propagado.....</i>	<i>60</i>
4.9	<i>Avaliação da influência de CCL5 e CX3CL1 na funcionalidade das células T específicas aos megapools de ZIKV.....</i>	<i>61</i>
5	<i>Discussão.....</i>	<i>65</i>
6	<i>Conclusões.....</i>	<i>76</i>
7	<i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>77</i>
8	<i>Anexos.....</i>	<i>93</i>
8.1	<i>Anexo A - Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa.....</i>	<i>93</i>
8.2	<i>Anexo B - Termos de Consentimento e Assentimento.....</i>	<i>95</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da partícula de flavivírus.....	4
Figura 2: O genoma do vírus dengue.....	5
Figura 3: Ciclo replicativo proposto para o ZIKV.....	8
Figura 4: Ciclos de transmissão vinculados ao vetor.....	9
Figura 5: Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpo.....	15
Figura 6: Pecado antigênico original das células T.....	18
Figura 7: Quimiocinas e seus receptores.....	21
Figura 8: Resposta aos <i>megapools</i> de peptídeos derivados de ZIKV em diferentes grupos de doadores.....	51
Figura 9: Detecção de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$ .....	53
Figura 10: Detecção de células T CD4+ e CD8+ com atividade citotóxica.....	55
Figura 11: Linfócitos T expressando CCR5 e CX3CR1 após estimulação <i>in vitro</i> com epítomos ZIKV.....	56
Figura 12: Subpopulações de Linfócitos T CD4+, CD4+IFN- $\gamma$ + e CD4+CD107a+ de acordo com a expressão de receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 seguido ou não da estimulação <i>in vitro</i> com epítomos ZIKV.....	58
Figura 13: Subpopulações de Linfócitos T CD8+, CD8+IFN- $\gamma$ + e CD8+CD107a+ de acordo com a expressão de receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 seguido ou não da estimulação <i>in vitro</i> com epítomos ZIKV.....	59
Figura 14: Titulação da massa viral de ZIKV por Plaque Assay.....	60
Figura 15: Influência de CCR5 e CX3CR1 sobre a funcionalidade das células T na reexposição <i>in vitro</i> ao isolado do ZIKV ou aos <i>megapools</i> de ZIKV.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituição dos <i>megapools</i> de peptídeos de ZIKV .....	33
Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados na marcação extracelular e intracelular por Citometria de fluxo.....	35
Tabela 3: Anticorpos monoclonais utilizados na marcação extracelular por Citometria de fluxo.....	38
Tabela 4: Anticorpos monoclonais utilizados na marcação extracelular por Citometria de fluxo.....	40
Tabela 5: Características das gestantes infectadas pelo ZIKV e de seus filhos expostos ao ZIKV durante a epidemia em 2016 e 2017.....	47
Tabela 6: Características das gestantes convalescentes infectadas pelo ZIKV recrutadas de 2018 a 2019.....	48

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Esquema de cultura de PBMCs com recombinantes de quimiocinas ou com anticorpos anti-quimiocinas.....	38
Quadro 2: Esquema de cultura de PBMCs com recombinantes de quimiocinas, ZIKV e MOCK.....	39
Quadro 3: Esquema de cultura de PBMCs com recombinantes de quimiocinas com megapool de ZIKV.....	40

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD = Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose  
ADE = Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*).  
APC = Célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*)  
ARC = Cruz vermelha americana  
ATB = Tuberculose ativa  
BSA = Albumina Bovina.  
C = Capsídeo  
C6/36 = Célula de mosquito *Aedes albopictus*  
CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças  
CHIKV = Vírus Chikungunya  
CMV = Citomegalovírus  
CPN = célula progenitora neural  
CR- = complexo replicativo  
CTL = Linfócito T citotóxico (do inglês *Cytotoxic T Lymphocyte*)  
DC-SIGN = Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de célula dendrítica (do inglês *DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin*).  
DENV = Vírus Dengue  
DENV-1 = Vírus da Dengue sorotipo 1.  
DENV-2 = Vírus da Dengue sorotipo 2.  
DENV-3 = Vírus da Dengue sorotipo 3.  
DENV-4 = Vírus da Dengue sorotipo 4.  
DMSO = Dimetil Sulfóxido (do inglês *Dimethyl sulfoxide*).  
DNA = Ácido desoxiribonucleico  
DPBS = do inglês Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline  
E = Envelope  
EDTA = Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)  
ELISA = Ensaio imuno-enzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).  
EliSpot = do inglês *enzyme-linked immune absorbent spot*  
FACS = Técnica de citometria de fluxo.  
Fc = Fragmento cristalizado.  
FcR $\gamma$  = Receptor para porção Fc de anticorpos classe  $\gamma$  (G).  
FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz  
H = hora  
HCV = vírus da hepatite C  
hiPC = Célula tronco pluripotente induzida  
HIV-1 = Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*).  
HLA = Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *Human leukocyte antigen*)  
HUAP = Hospital Universitário Antônio Pedro  
ICS = Marcação intracelular de citocinas (do inglês *intracellular cytokine staining*)  
ICTV = Internacional de Taxonomia de Vírus  
ID = Identidade  
IEDB = Banco de Dados de Epitopos Imunes (do inglês, *Immune Epitope Database*)  
IFN- $\alpha$  = Interferon alfa  
IFN- $\beta$  = Interferon beta  
IFN- $\gamma$  = Interferon gama.  
IgG = Imunoglobulina G  
IgM = Imunoglobulina M  
IL-1 $\beta$  = Interleucina -1 beta.  
ILT6 = Infecção latente por tuberculose  
IOC = Instituto Oswaldo Cruz  
Iono = Ionomicina

JEV = Vírus encefalite japonesa  
Kb = Quilobase  
kDa = Quilo Daltons  
LACEN-RJ = Laboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro  
LIV = Laboratório de Imunologia Viral  
M = Membrana  
MHC = Complexo de Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)  
MIP-1 $\beta$  = Proteína Inflamatória de Macrófago-1 $\alpha$  (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$* ).  
MOI = Índice de multiplicidade da infecção (do inglês *multiplicity of infection*)  
NaN3 = Azida de sódio  
NAT = do inglês *nucleic acid testing*  
Neg = negativo  
ng/ $\mu$ L = nanogramas por microlitro  
NK = Natural *Killer*.  
nNm= nanometro  
NS = Proteína não-estrutural.  
NS1 = Proteína Não estrutural 1  
NS2 = Proteína Não estrutural 2  
NS3 = Proteína Não estrutural 3  
NS4 = Proteína Não estrutural 4  
NS5 = Proteína Não estrutural 5  
OMS = Organização Mundial de Saúde.  
ORF = Fase aberta de leitura (do inglês *Open Reading Frame*).  
PBCs = Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).  
PBS = Tampão salina fosfato.  
PCR = Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)  
PFA = paraformaldeído  
PFU = Unidade formadora de palca (do inglês *plaque-forming units*)  
PHA = Fitohemaglutinina (do inglês *phytohaemagglutinin*)  
PMA = Acetato de miristato de forbol  
Pos = positivo  
prM = Precursor da proteína M.  
PRNT = teste de neutralização de redução de placa (do inglês *Plaque reduction neutralization test*)  
RE = Retículo endoplasmático  
RER = Retículo endoplasmático rugoso  
rh = Reconbinante  
RJ = Rio de Janeiro  
RNA = Ácido ribonucléico (do inglês *Ribonucleic Acid*)  
Rpm = Rotações por minuto  
RpRd = RNA polimerase RNA dependente  
RT-PCR = Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa  
RT-qPCR = Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real com transcrição reversa  
SCZ = Síndrome congênita do zika  
SE = Semana Epidemiológica  
SFB = Soro Fetal Bovino.  
SFCs = Células Formadoras de Spot  
SGB- Síndrome Guillain-Barré  
SNC = Sistema nervoso central  
ssRNA = Ácido ribonucléico de fita simples (do inglês *Ribonucleic Acid single strain*)  
STORCH = Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simplex  
SVS/MS = Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde.

TBEV = Vírus encefalite transmitida por carrapato  
TCLE = Termo de consentimento de Livre e Esclarecido  
TCR = Receptor de Célula T  
TDLAV = Vacina atenuada tetravalente de dengue  
TE = Tris-EDTA  
Th1 = Linfócito T auxiliar 1 (do inglês *T Helper - 1*)  
Th2 = Linfócito T auxiliar 2 (do inglês *T Helper - 2*)  
UDE = Unidade de Doenças Exantemáticas  
UFF= Universidade Federal Fluminenses  
UTR = Regiões não traduzidas (do inglês, *untranslated region*)  
Vero = Linhagem celular de células renais de primata *Cercopithecus aethiops* (Macaco-Verde Africano)  
VILH = Vírus Ilheus  
WNV = Vírus este do Nilo  
YFV = Vírus da febre amarela  
ZIKV = Vírus Zika  
 $\mu\text{L}$  = microlitros

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Histórico e Epidemiologia.**

Em 1947, a floresta Zika foi escolhida como uma das áreas de estudos sobre o vírus da febre amarela, por um grupo de pesquisadores na península de Entebbe (Uganda). Macacos rhesus (*Macaca mulatta*) foram colocados em plataformas de madeira na copa das árvores, ao longo da floresta, sendo observados diariamente. Foi a partir daí que ocorreu o primeiro isolamento de um vírus até então desconhecido. O segundo isolamento deste mesmo vírus foi feito a partir de um pool de mosquitos *Aedes africanus*, coletado em janeiro de 1948, na mesma floresta. Devido à suspeita da importância do ciclo florestal da febre amarela na época, o segundo isolamento viral foi inoculado por via subcutânea em um macaco rhesus. O soro do animal foi capaz de neutralizar a suspensão viral tanto do isolado do pool de mosquitos, quanto do primeiro isolado proveniente do macaco rhesus 766, indicando que os dois isolamentos consistia do mesmo vírus que circulava de forma endêmica naquela região (Dick et al 1952). O vírus foi então chamado de vírus Zika (ZIKV) devido a localidade de onde foram feitos os isolamentos.

Faye e colaboradores (2014) avaliaram a propagação viral e a epidemiologia molecular de 37 isolados de ZIKV coletados entre 1968 e 2002 em 6 localidades no Senegal e na Costa do Marfim, incluindo também linhagens de outros seis países. Com este estudo, a análise filogenética do vírus indicou sua origem em 1920 em Uganda e duas introduções na África Ocidental em tempos diferentes, que deram origem a duas linhagens africanas distintas. Ainda, a análise filogenética coloca a hipótese do vírus ter migrado de Uganda para a Malásia em 1945 e da Malásia para a Micronésia em 1960, estabelecendo a linhagem asiática (Faye et al. 2014). O primeiro relato de uma infecção causada por ZIKV em humanos ocorreu na Nigéria em 1954, onde dos 3 casos suspeitos, somente um deles foi confirmado como infecção pelo ZIKV (MacNamara 1954).

Durante décadas, na África e na Ásia tiveram casos esporádicos da doença. Entre abril e maio de 2007, na ilha Yap, Micronésia, ocorreu um surto de uma doença caracterizada por erupções cutâneas, conjuntivite, febre baixa, artralgia e artrite que se assemelhava a DENV. Durante investigações sorológicas, em 3 pacientes foram detectados anticorpos IgM anti-DENV. Meses depois, as amostras coletadas dos pacientes durante o surto foram enviadas para investigação no Laboratório de

Referência e Diagnóstico de Arbovírus do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em Fort Collins, Colorado. Foram realizados ensaios sorológicos, ensaio de neutralização de placa e ensaio de reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR). Os dados demonstraram que cerca de 73% dos indivíduos estudados apresentam anticorpos IgM anti-ZIKV, indicando o vírus como o agente causador da epidemia que ocorreu na ilha Yap, na Micronésia (Duffy et al. 2009)

Em outubro de 2013, foi relatado um grande surto causado por ZIKV na Polinésia Francesa (Cao-Lormeau et al. 2014). Durante o mesmo período, foi relatado um aumento no número de casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB), sugerindo uma possível associação com a infecção pelo ZIKV. No estudo realizado por Cao-Lormeau e colaboradores (2016), 42 pacientes adultos diagnosticados com SGB apresentaram anticorpos neutralizantes contra ZIKV e 41 pacientes apresentaram IgM ou IgG anti-ZIKV. Assim, foi descrito pela primeira vez complicações neurológicas graves relacionadas à infecção (Cao-Lormeau et al. 2016). A análise filogenética revelou que ZIKV foi o responsável pelo surto da Polinésia Francesa e que este isolado era mais próximo aos isolados dos surtos ocorridos no Sudeste Asiático do que da estirpe da Ilha Yap, sugerindo uma introdução independente. Após o surto na Polinésia Francesa, o vírus dispersou-se por outras ilhas do Pacífico, onde foram reportados casos em 2014 na Nova Caledônia, nas Ilhas Cook e na Ilha da Páscoa e, já em 2015, nas Ilhas Salomão, Vanuatu, Samoa e Fiji (Musso and Gubler 2016).

No Brasil, o primeiro caso autóctone notificado ocorreu na Bahia. Das amostras de sangue coletadas de 24 casos, 7 foram positivos para ZIKV, porém as amostras positivas não foram sequenciadas para confirmação e avaliação da linhagem circulante (Campos et al 2015). No mesmo mês foram notificados casos de ZIKV no estado do Rio Grande do Norte, em março de 2015. Pacientes deram entrada apresentando sinais e sintomas semelhantes a infecção causada por DENV, como artralgia, edema nas extremidades, febre branda, exantema maculopapular, dor de cabeça, dor retroorbital, conjuntivite, mialgia e desordens digestivas. Na época, dois arbovírus circulavam no país no mesmo período, vírus dengue (DENV) e vírus Chikungunya (CHIKV). Após realização de teste laboratoriais, foi descartado a infecção por ambos os vírus. As amostras foram então testadas para ZIKV dando positivo em 8 das 21 amostras de soro enviadas ao Instituto Oswaldo Cruz no Paraná

(Zanluca et al. 2015). Análises filogenéticas demonstram o agrupamento dos isolados com a linhagem Asiática.

No estado do Rio de Janeiro, o primeiro caso autóctone ocorreu em um paciente HIV positivo, em maio de 2015. A análise filogenética do ZIKV detectado no soro do paciente revelou que o vírus circulante se agrupava na linhagem Asiática (Calvet et al. 2016). De acordo com o boletim epidemiológico, quase 300 mil casos foram notificados por todo o país, nos quais, mais de 70 mil casos foram notificados no Rio de Janeiro em 2016 (Ministério da Saúde, 2017). Entre 2017-2019 notou-se uma queda brusca de casos notificados de infecções por ZIKV ao Ministério da Saúde. Em 2017, foram notificados no Brasil mais de 17 mil casos, sendo mais de 2 mil no estado do Rio de Janeiro (Ministério da Saúde, 2018). No ano seguinte, 2018, foram quase 9 mil casos notificados no país com mais de 2 mil casos no Rio de Janeiro (Ministério da Saúde, 2019). E em 2019, até a semana epidemiológica 40, foram notificados mais de 10 mil casos suspeitos de infecção pelo ZIKV. No que diz respeito a gestantes e bebês, entre 2015-2019 foram mais de 12 mil casos confirmados em gestantes e 3 mil bebês nasceram com alterações associadas à infecção (Ministério da Saúde 2019).

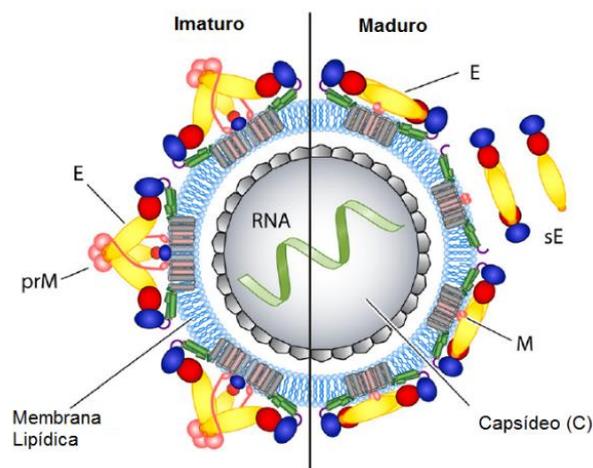
## **1.2. Vírus Zika.**

### **1.2.1. Classificação, características virais e seu genoma.**

Os vírus são divididos em famílias e sua classificação é regulada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Atualmente, algumas das famílias mais representativas para a saúde pública por causar epidemias importantes com infecções em humanos e em animais são oriundas das famílias de vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus), como, por exemplo, a família *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Flaviviridae* (Bolling et al. 2015).

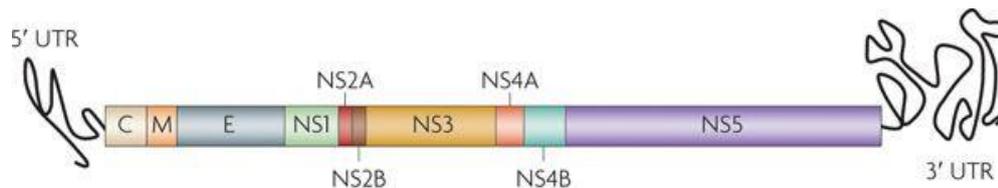
A família *Flaviviridae* possui quatro gêneros descritos, *Pestivirus* (11 espécies), *Pegivirus* (11 espécies), *Hepacivirus* (14 espécies) e *Flavivirus* (53 espécies). Alguns dos membros do gênero *Flavivirus* são vírus Ilheus (VILH), vírus encefalite japonesa (JEV), vírus encefalite transmitida por carrapato (TBEV), vírus Oeste do Nilo (WNV), vírus da febre amarela (YFV), vírus dengue (DENV) e vírus Zika (ZIKV) (ICTV, 2019). Portanto, ZIKV é um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*.

Os membros da família *Flaviviridae* apresentam uma partícula viral de aproximadamente 40 a 60 nm de diâmetro, envelopada, com núcleocapsídeo icosaédrico (**Figura 1**). Seu genoma é composto por RNA de fita simples, polaridade positiva de aproximadamente 10 kb com 2 regiões não codificantes flanqueadas (5' e 3' NCR) e um único quadro de leitura aberta (ORF, *open reading frame*). O genoma viral codifica uma poliproteína que dará origem a 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais (Kuno and Chang 2007).



**Figura 1: Estrutura da partícula de flavivírus.** Representação esquemática de partícula viral imatura (lado esquerdo) e madura (lado direito) mostrando proteína do capsídeo (C); precursor da proteína da membrana (prM) e membrana (M); proteína do envelope (E) (Adaptado de Heinz and Stiasny 2017).

Dentre as proteínas estruturais, temos: capsídeo (C) que é o componente estrutural do núcleocapsídeo, proteína precursora de membrana (prM)/membrana (M) que é uma proteína transmembranar que interage com a proteína do envelope e o envelope (E), que é a principal proteína estrutural que realiza interação com receptores celulares e fusão de membranas, sendo também um dos principais alvos para resposta imune humoral juntamente com a prM. Dentre as proteínas não estruturais temos NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (**Figura 2**).



**Figura 2: O genoma do vírus dengue.** Regiões não traduzidas (UTR), três proteínas estruturais (glicoproteínas do capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E)) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Guzman et al. 2010).

Durante a replicação viral, todas as proteínas não estruturais vão formar o chamado complexo replicativo (CR), que é formado a partir da invaginação da membrana do retículo endoplasmático (RE) no lúmen, contendo um poro que liga o interior da vesícula ao citoplasma. O CR coordena as etapas do ciclo viral pela segregação espacial do RNA viral, usado de molde na replicação, ribossomos e capsídeos virais submetidos à montagem. Nesse processo, uma rede complexa e dinâmica de várias interações RNA-RNA e RNA-proteína deve ser estabelecido no contexto da barreira física fornecida pela membrana do retículo endoplasmático (RE). A utilização da membrana do RE propicia a proteção contra nucleases da células hospedeiras e também à prevenção de sensores de imunidade inata, como os membros da família RIG-I, que podem detectar moléculas de RNA de dupla fita (Klema et al 2015).

A proteína não estrutural NS1 é uma glicoproteína monomérica de aproximadamente 48 kDa que pode ser dimerizada no retículo endoplasmático. Assim como as outras proteínas não estruturais, a NS1 participa do complexo replicativo juntamente com outras proteínas transmembranares (NS2A, NS4A e NS4B) e com proteínas citoplasmáticas (NS3, NS2B e NS5). A NS1 pode ser encontrada na superfície de células infectadas, na membrana intracelular ou secretada durante o processo replicativo, como um hexâmero circulando no sangue durante fase aguda da doença. Na forma secretada, NS1 poderia induzir a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (Gutsche et al. 2011). Além disso, devido a sua capacidade de induzir a cascata de ativação do Sistema Complemento e ao fato de que anticorpos específicos para NS1 podem reagir de forma cruzada com células endoteliais, esta proteína poderia estar envolvida no extravasamento vascular observado nos pacientes infectado pelo DENV (revisado por Herrero et al. 2013).

NS2A é uma proteína transmembranar hidrofóbica pequena (22 kDa) que tem papel crucial no ciclo replicativo viral por participar da montagem e liberação do vírus através da sua interação com as proteínas NS3 e NS5. Além de induzir efeito citopático. A porção N terminal e C terminal de NS2A é processada por uma protease do hospedeiro ligada à membrana e pela protease viral (NS2B/NS3) (Wu et al. 2017). A NS2B também é uma proteína pequena (~14KDa) associada à membrana, que forma um complexo estável com a NS3 na membrana convoluta induzida pelos Flavivírus. A interação da porção hidrofóbica da NS2B com a proteína NS3, atua como um cofator para a protease NS2B-NS3. NS2B-NS3 é uma das enzimas mais conservadas entre os Flavivirus possuindo atividades de protease, helicase e RNA trifosfatase estimuladas pela ligação de RNA fita simples (ssRNA) (Lescar et al. 2018).

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional grande (~70KDa) que tem importância no processamento da poliproteína e na replicação do RNA. A extremidade N-terminal da proteína apresenta atividade de protease da NS2B-NS3 clivando NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5. Apresenta também atividade de helicase, devido à sua interação com NS5 (Lescar et al. 2018).

A NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas (~16 KDa e ~27 KDa, respectivamente). A NS4A é responsável por ancorar componentes citosólicos do complexo replicativo à membrana. Interage com outras proteínas no complexo replicativo como a NS1, NS2A, NS3 e NS5 e se localiza em regiões perinucleares gerado no processo replicativo. A NS4B se associa com NS2B-NS3 e NS5 no complexo replicativo e é responsável pela inibição da via de sinalização de IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$ . Ele está, portanto, associada à virulência e à inibição da resposta imune inata (Reddy et al 2018).

Por fim, NS5 (103 kDa) é altamente conservada entre os flavivírus. Seu domínio N-terminal apresenta função de polimerase metiltransferase responsável pela formação do Cap na região terminal 5' do genoma viral. Já seu domínio C-terminal apresenta função de RNA polimerase RNA-dependente (RpRd) sendo deslocado para o núcleo durante a replicação viral (Zhao et al. 2017).

### **1.2.2. Replicação viral do ZIKV e outros Flavivírus.**

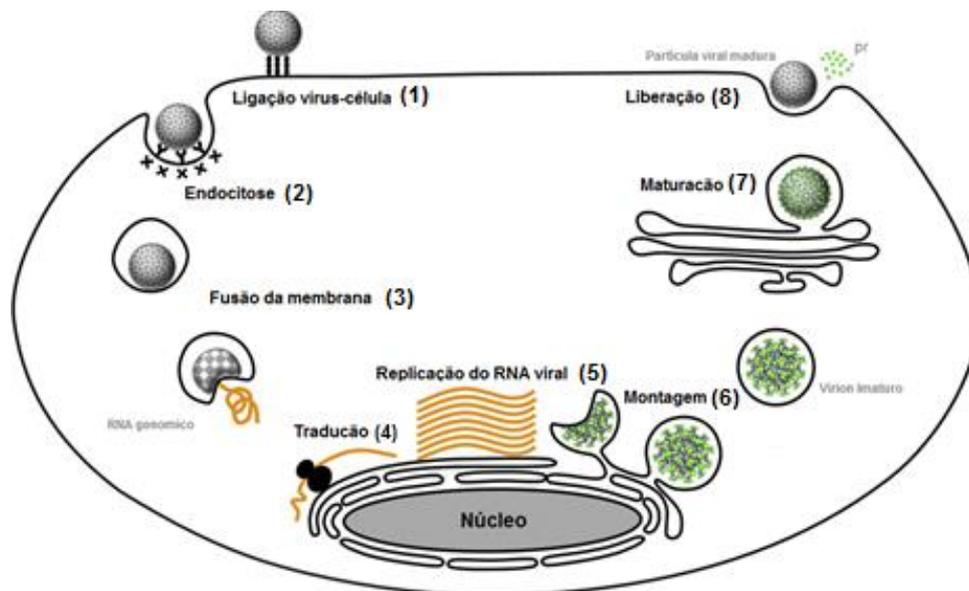
A presença do ZIKV nas glândulas salivares do vetor acontece após o chamado período de incubação extrínseca, cerca de 14 dias a partir do momento em que o mosquito picou um hospedeiro vertebrado infectado (revisado por Hugo et al. 2019). Após esse período de incubação, caso o mosquito faça novo repasto sanguíneo, será capaz de transmitir o vírus.

ZIKV é capaz de infectar células presentes no local da inoculação, como fibroblastos, queratinócitos, células de Langerhans (células dendríticas residentes da pele), monócitos e macrófagos (revisado por Sager et al. 2018). A ocorrência de viremias, período no qual o vírus atinge a circulação sanguínea, e a sua circulação nas células infectadas como as apresentadoras de antígenos, permite que o vírus chegue a diferentes locais do corpo, incluindo aqueles relacionados às patologias relacionadas ao zika, como placenta e testículos.

A replicação viral (**Figura 3**) começa quando o vírus se liga aos receptores da membrana plasmática das células do hospedeiro como por exemplo às famílias de receptores TIM-1 e TAM (Tyro3 e AXL) e aos receptores DC-SIGN (Hamel et al. 2015), seguido de sua internalização por endocitose mediada por clatrina, de maneira dependente da glicoproteína E viral (Kaufmann and Rossmann 2011). O pH ácido do endossomo causa modificações conformacionais no envelope viral (E), o que resulta na fusão da E com a membrana do endossomo, liberando assim, o nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula. A replicação do RNA viral ocorre em associação com o retículo endoplasmático rugoso (RER). São formadas estruturas de membrana induzidas por vírus conhecidos como complexos de replicação (CR), formados pelo RNA viral e suas proteínas não estruturais, além de um conjunto de fatores da célula hospedeira necessários para a síntese de RNA viral (Gillespie et al. 2010).

As moléculas de RNA recém-sintetizadas poderão ser utilizadas para a tradução e replicação viral ou são enviadas para a região de montagem dos novos virions. Os RNAs que seguirem para tradução serão responsáveis pela geração da poliproteína, e a ação da protease viral (NS2B-NS3) é importante para clivar as proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais seguirão para o local próximo da replicação onde ocorre a montagem da nova partícula viral e associação com o RNA recém-sintetizado, formando uma partícula viral imatura. Essas partículas virais imaturas entram na via secretória, onde ocorre a clivagem da proteína prM em M, se

tornando assim uma partícula viral madura, capaz de infectar outras células. Essas partículas são enviadas até a membrana da célula hospedeira onde são liberadas via exocitose juntamente com prM clivado (Pierson and Diamond 2012).



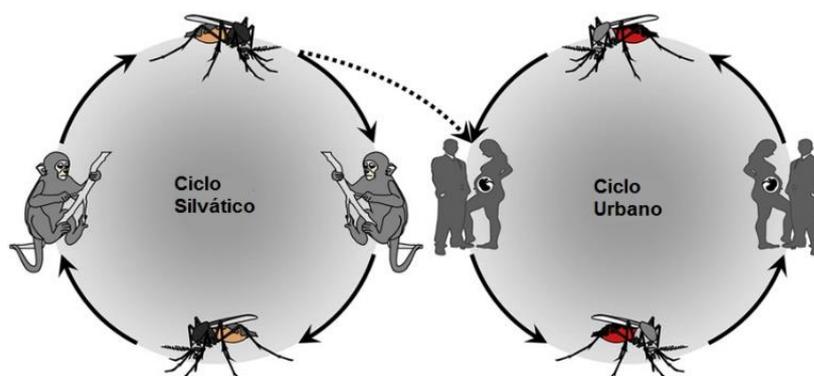
**Figura 3: Ciclo de replicativo proposto para o ZIKV.** Oito etapas principais do ciclo de replicação viral são indicados: (1) Interação vírus-célula, (2) endocitose via receptores presentes nas células do hospedeiro, (3) fusão de membranas virais e do hospedeiro no endossoma com pH ácido, (4) tradução, (5) replicação de RNA viral em regiões do RE onde há formação do complexo de replicação, (6) montagem, (7) clivagem da prM para maturação do vírus maduro e (8) liberação do virion maduro por exocitose (Adaptado de Song *et al* 2017).

### 1.2.3. Rotas de infecção.

Os arbovírus, do inglês “*arthropode-borne virus*”, são vírus transmitidos por artrópodes, como por exemplo, mosquitos, carrapatos, entre outros (Gubler 1998). São vírus mantidos na natureza, principalmente por conta de ciclos que envolvem vetores artrópodes-hematófagos que são capazes de se infectar com um patógeno por via oral. Esses vetores sobrevivem à replicação do patógeno em seu interior e são capazes de transmití-lo a um hospedeiro susceptível (Figueiredo 2007; Fauci and Morens 2016).

São descritos dois ciclos principais: (i) ciclo silvático, envolvido na manutenção do ZIKV entre primatas não-humanos e mosquitos arbóreos nas florestas; e (ii) ciclo urbano, envolvido na transmissão do ZIKV entre seres humanos e mosquitos

presentes em regiões urbanas. Ocasionalmente, o vírus é transmitido por mosquitos presentes em regiões de mata tendo como origem primatas não-humanos. Quando humanos entram nas regiões de mata onde o vírus circula, ele pode ser contaminado pela picada do mosquito infectado (**Figura 4**). ZIKV já foi isolado a partir de várias espécies diferentes de mosquitos do gênero *Aedes* (*A. aegypti*, *A. africanus*, *A. albopictus*, *A. apicoargenteus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. opok* e *A. vittatus*), que podem atuar como vetores para transmissão viral em um determinado ambiente dessas áreas endêmicas (Song et al. 2017). No Brasil, a transmissão de ZIKV se dá principalmente por picada de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Outras rotas de infecção vêm sendo discutidas, como a transfusão de sangue, transmissão vertical e transmissão sexual (Sakkas et al 2016).



**Figura 4: Ciclos de transmissão vinculados ao vetor.** Existem dois ciclos de transmissão relacionados aos mosquitos: (1) ciclo silvático, no qual o vírus circula entre primatas não humanos e mosquitos arbóreos; e (2) ciclo urbano, em que o vírus circula entre humanos e mosquitos urbanos. Sob certas circunstâncias, o ZIKV pode ser transmitido de primatas para seres humanos através de mosquitos arbóreos. (Adaptado de Song et al. 2017).

As infecções vinculadas a transfusão de sangue foram estudadas por Saa e colaboradores (2019). No momento suspeito da introdução do ZIKV em Porto Rico, estavam ocorrendo concomitantemente surtos de vírus chikungunya (CHIKV) e dengue (DENV) no país. Devido à ausência de testes de triagem nos bancos de sangue e o risco de transmissão de CHIKV e DENV por transfusões, a Cruz Vermelha Americana (ARC) fez uma parceria com a *Cerus Corporation* para distribuir concentrados de plaquetas com reduzido risco de contaminação de patógenos, a partir de fevereiro de 2015. Devido a coincidência temporal do estudo e da introdução

do ZIKV em Porto Rico, foi realizada uma triagem retrospectiva de amostras de repositórios coletados entre fevereiro de 2015 e maio de 2016, que identificou infecção aguda pelo ZIKV em uma das 788 amostras de doadores de plaquetas que não foram transfundidos. Esse estudo reforçou a importância de ser realizado um *screening* das doações de banco de sangue, utilizando metodologias de identificação de material genético viral, como por exemplo NAT (do inglês *nucleic acid testing*), além da importância de utilizar metodologias que sejam capazes de reduzir possíveis patógenos presentes nas bolsa de sangue (Saa et al. 2019).

Estudos indicaram possível transmissão sexual nos Estados Unidos em 2016. Foram relatados 9 casos de transmissão sexual de ZIKV nos Estados Unidos. Os casos reportados tiveram início em homens que haviam viajado recentemente para áreas com transmissão ativa do ZIKV, incluindo Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Haiti, Porto Rico e Suriname. Todas as mulheres apresentaram pelo menos um dos sintomas característicos de infecção pelo ZIKV e nenhuma delas reportou viagem recente para áreas endêmicas. Para o diagnóstico dos casais com suspeita de transmissão sexual, foram realizados ensaios de RT-qPCR, ensaio de imunoabsorção enzimática de captura de anticorpos imunoglobulina M (IgM) (MAC-ELISA) e ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT). Todos os viajantes tiveram evidências laboratoriais de infecção recente por ZIKV ou infecção por algum flavivírus. Um dos viajantes apresentou RT-qPCR positivo para ZIKV, 5 apresentaram detecção de IgM anti-ZIKV e positividade nos testes de anticorpos neutralizantes e 3 pacientes tiveram detecção de IgM anti-flavivírus e positividade nos testes de anticorpos neutralizantes. Nesse estudo também foi possível detectar RNA viral em amostra de sêmen até 48 dias após início dos sintomas (Russell et al. 2017).

Os relatos da incidência de microcefalia no Brasil se sobrepõem geograficamente aos locais onde houve relatos de infecção por ZIKV. A maioria das mães cujos bebês foram diagnosticados com microcefalia queixaram-se durante a gravidez de manifestações clínicas, como febre baixa, dor de cabeça e erupções cutâneas, que podem ter sido sintomas de infecção pelo vírus ou por outra espécie de arbovírus prevalente na região. Melo e colaboradores (2016) examinaram duas mulheres grávidas do estado da Paraíba, cujos filhos tiveram diagnóstico de microcefalia fetal e ambas relataram sintomas relacionados à infecção pelo ZIKV. Foi detectado o genoma do vírus no líquido amniótico de ambas as mulheres grávidas,

mas o vírus não foi detectado na urina ou no soro destas mulheres visto que as amostras foram coletadas após o diagnóstico de microcefalia por imagem. Os resultados encontrados pelo grupo, indicam associação entre o ZIKV e os casos de microcefalia em neonatos no Brasil, sugerindo que o vírus pode atravessar a barreira placentária (Oliveira Melo et al. 2016; Calvet et al. 2016).

O genoma viral foi detectado em diferentes fluidos corporais como urina (Gourinat et al. 2015), saliva (Musso et al. 2015), leite materno (Besnard et al. 2014) e fluido vaginal (Paz-Bailey et al. 2018).

#### **1.2.4. Manifestações clínicas.**

A epidemia causada por ZIKV em 2015-2016 se tornou um desafio para a saúde pública, porque além das características clínicas que se sobrepõem às doenças causadas por outro arbovírus que já circulam no país, como DENV e CHIKV, surgiram complicações graves relacionadas à infecção.

Cerca de 80% das infecções pelo ZIKV são assintomáticas (Ministério da Saúde 2015; Bogoch et al. 2016). Duffy e colaboradores realizaram investigações sorológicas em 557 indivíduos residentes nas Ilhas Yap, Micronésia. Dos 557 indivíduos participantes, 414 tiveram IgM anti-ZIKV positivo (74%). Dos indivíduos que tiveram detecção de IgM anti-ZIKV, 156 indivíduos (38%) relataram alguma sintomatologia característica de infecção por ZIKV, os demais, portanto, desenvolveram infecções assintomáticas (Duffy et al. 2009).

Os indivíduos que apresentam sintomatologia podem apresentar uma doença leve e autolimitada, com um período de incubação de 4-10 dias. Entre os sintomas já descritos, os indivíduos infectados podem apresentar febre, erupção cutânea, mialgia, artralgia, conjuntivite, dor retro-orbital, dor de cabeça, edema e vômito (Sakkas et al 2016; Song et al. 2017). Embora a infecção causada por ZIKV tenha sido descrita como uma infecção leve, existem relatos de alterações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), encefalite, mielite transversa, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica em adultos e malformações congênitas, como a Síndrome congênita do Zika (SCZ) em crianças (Cao-Lormeau et al. 2016; Créange 2016; Oliveira Melo et al. 2016).

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma doença autoimune, na qual o sistema imunológico acomete parte do sistema nervoso periférico, causando formigamento,

fraqueza muscular, paralisia e até morte (Créange 2016). O primeiro estudo que abordou uma possível associação entre a infecção pelo ZIKV e o desfecho neurológico foi realizado por Cao-Lormeau e colaboradores (2016). Entre outubro de 2013 e abril de 2014, a Polinésia Francesa presenciou o maior surto de ZIKV até o momento. As investigações virológicas incluíram RT-PCR para ZIKV, ensaios de imunofluorescência e soroneutralização por microesferas para ZIKV e DENV. Quarenta e dois pacientes foram diagnosticados com SGB durante o período do estudo, 98% deles tinham IgM ou IgG anti-ZIKV, e todos apresentavam anticorpos neutralizantes contra o ZIKV. Cerca de 88% haviam experimentado uma doença autolimitada compatível com sintomas presentes em uma infecção causada por ZIKV, em média 6 dias antes do início dos sintomas neurológicos, sugerindo infecção recente por ZIKV. Esses resultados indicam possível ligação da infecção por ZIKV e o desenvolvimento de SGB (Cao-Lormeau et al. 2016).

No Brasil, Da Silva e colaboradores (2017) avaliaram as taxas de infecção aguda por ZIKV em pacientes hospitalizados e diagnosticados com SGB, meningoencefalite ou mielite transversa, entre dezembro de 2015 e maio de 2016. Amostras de soro e líquido cefalorraquidiano foram testadas para o ZIKV usando RT-qPCR e um ensaio de imunoabsorção ligado à enzima de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA). Foram incluídos 40 pacientes, destes 29 (73%) com SGB, 7 (18%) com encefalite, 3 (8%) com mielite transversa e 1 (3%) com polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica. Os resultados dos diagnósticos moleculares e sorológicos mostraram que 35 pacientes (88%) apresentaram evidências moleculares e/ou sorológicas de infecção recente por ZIKV em pelo menos um dos materiais coletados. Dos pacientes positivos para a infecção pelo ZIKV, 27 apresentaram SGB, 5 tiveram encefalite, 2 mielite transversa e 1 polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica. Sendo então associado, nesta coorte brasileira, a um aumento na incidência de um espectro diverso de síndromes neurológicas graves relacionado com infecção por ZIKV (Da Silva et al. 2017).

A Síndrome Congênita do Zika (SCZ) é caracterizada por alterações congênitas em fetos e recém-nascidos infectados pelo ZIKV durante a gravidez. Essa síndrome resulta do dano neurológico direto causado pela replicação viral nas células progenitoras neurais e indução da apoptose ou necrose das células neurais. Esses eventos de morte celular reduzem o volume da cabeça e promovem a calcificação

cortical, bem como o aumento ventricular (Schuler-Faccini et al. 2016). As sintomatologias relatadas em bebês com SCZ são microcefalia, calcificação do sistema nervoso central, hidrocefalia, desproporção craniofacial; alterações oculares, tônus muscular e postural; reflexos primitivos exagerados, hiperexcitabilidade, hiperirritabilidade, artrogripose e deformidades articulares (Ministério da Saúde, 2017).

A ocorrência de malformações congênitas associadas ao ZIKV durante a gestação depende de uma variedade de fatores, dentre eles, a carga viral e a resposta imune e genética do hospedeiro. Caires-Júnior e colaboradores analisaram as células progenitoras neurais de pares de gêmeos dizigóticos discordantes para o desenvolvimento da SCZ. Foram coletadas amostras de sangue de 3 pares de gêmeos dizigóticos discordantes em relação ao desenvolvimento da síndrome. Os autores isolaram célula-tronco humana pluripotente induzida (hiPC) derivadas de eritroblastos das crianças, que foram em seguida diferenciadas em células progenitoras neuronais. As células progenitoras neuronais foram infectadas *in vitro* com uma cepa brasileira de ZIKV. Os resultados demonstraram que crianças afetadas que desenvolveram a SCZ são mais permissivas à infecção comparada às não-afetadas. Com base em análises de expressão gênica das células progenitoras neurais dos bebês com SCZ e dos não-afetados, os autores sugeriram que os dois grupos de bebês têm assinaturas de expressão gênica significativamente diferentes. Essas diferenças eram principalmente em regiões reguladoras que levam a diferentes respostas epigenéticas, e a uma maior susceptibilidade aos efeitos patológicos do ZIKV nos bebês com SCZ em comparação ao grupo de bebês não-afetados (Caires-Júnior et al. 2018).

Até o dado momento, nenhum estudo foi publicado avaliando a resposta das células T de mulheres que foram infectadas durante a gravidez pelo ZIKV, nem de seus filhos.

### **1.3. *Imunopatogênese.***

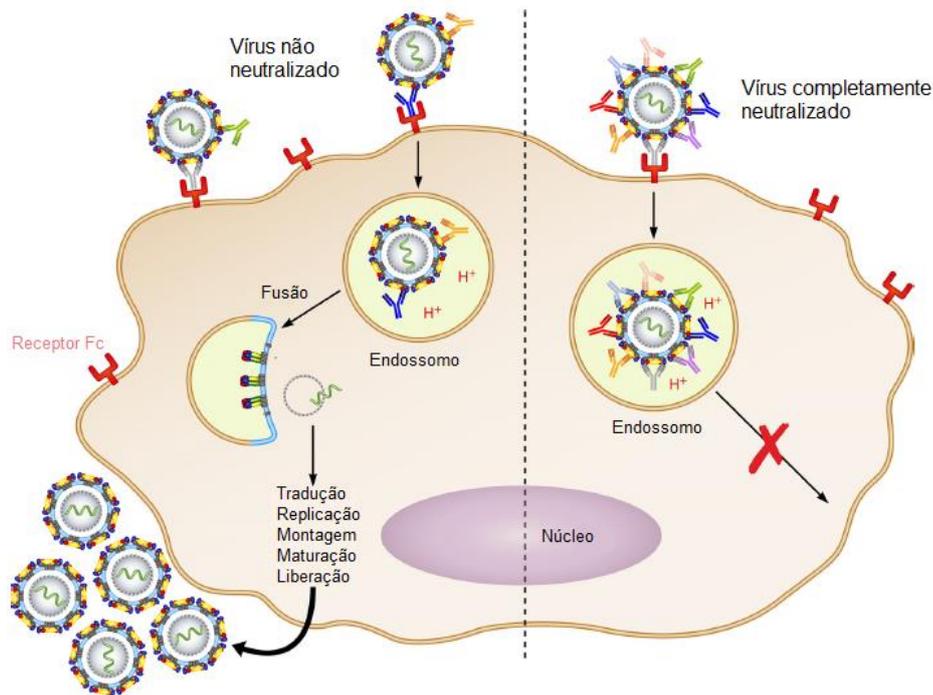
DENV e ZIKV pertencem ao mesmo gênero e a mesma família, compartilhando uma alta homologia de sequências proteicas. Os quatro sorotipos DENV compartilham aproximadamente 70% de identidade de aminoácidos entre si, enquanto o ZIKV exibe

uma homologia global de 43% com DENV (com até 68% de identidade para proteínas não estruturais mais conservadas) (Lazear and Diamond 2016).

Algumas teorias são discutidas principalmente em infecções causadas por DENV, mas o aparecimento de ZIKV em regiões endêmicas de DENV levantou uma questão crítica de como a interação das imunidades entre ZIKV e DENV influenciaria o desfecho clínico do paciente. As teorias mais discutidas são a teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE), a Teoria do Pecado Antigênico Original e a teoria da Tempestade de citocinas.

### ***1.3.1. Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE).***

O DENV apresenta 4 sorotipos antigenicamente distintos (DENV1-4), com aproximadamente 67-75% de homologia estrutural entre eles (Guzman et al. 2016; Botta 1944). A teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE) é o fenômeno em que anticorpos sub ou não neutralizantes facilitam a entrada de vírus heterólogos nas células hospedeiras, sendo mais bem caracterizada para DENV e ainda discutida para ZIKV. Essa teoria estabelece que anticorpos específicos de um sorotipo conferem imunidade ao longo da vida para o sorotipo homólogo. Mas, quando o indivíduo se infecta por um sorotipo heterólogo, os anticorpos gerados na primeira infecção são capazes de se ligar ao vírus infectante, mas não são capazes de neutralizá-lo, pois a ligação é de baixa avidéz. A interação vírus e anticorpo sub- ou não-neutralizante facilitaria a entrada do vírus na célula hospedeira, via receptores Fcγ. Dentro da célula, com a redução do pH do endossomo, o complexo vírus-anticorpo se desprenderão um do outro, potencializando assim a replicação viral (**Figura 5**).



**Figura 5: Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpo.** Em células que expressam o receptor Fc $\gamma$ , os complexos vírus-anticorpo são internalizados através da endocitose mediada pelo receptor Fc. Por causa da neutralização incompleta, o vírus pode se fundir no endossomo e dar início a replicação viral. Complexos imunológicos contendo o vírus completamente neutralizado também pode ser absorvidos pelas interações com o receptor Fc, mas não se funde no endossomo e, portanto, não leva a produção de mais partículas virais (lado direito) (Adaptado de Heinz and Stiasny 2017).

A imunidade humoral mediada por anticorpos desempenha um papel crucial no controle de infecções virais. Em 1973, estudo realizado por Halstead e colaboradores, postulou essa teoria baseados em estudos feitos em macacos Rhesus monotipicamente imunes aos sorotipos DENV-1, -3 ou -4 e que foram em seguida, infectados com DENV-2. Outro grupo de macacos nunca tinham sido expostos aos sorotipos de DENV e foram infectados também com o DENV-2. Os macacos imunes a qualquer um dos três sorotipos, quando infectados com DENV-2, apresentaram maiores títulos virais no sangue comparados aos animais não-imunes infectados com DENV-2. Sendo uma das primeiras descrições da teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos na dengue (Halstead et al 1973).

O principal alvo da resposta humoral tanto para o DENV, como para o ZIKV é a proteína E. A proteína E apresenta cerca de 60–75% idêntica entre os sorotipos do DENV. Entre ZIKV e os sorotipos virais, a identidade é de 54–59% (Dowd et al. 2016; Diamond et al 2018; Ngoni and Shresta 2018). Como a infecção pelo ZIKV no Brasil

ocorreu em áreas onde a população já tinha sido exposta aos sorotipos de DENV em anos anteriores, e considerando que o ZIKV é um flavivírus intimamente relacionado ao DENV, vários questionamentos foram gerados sobre a possibilidade de reação cruzada entre DENV e ZIKV.

Em estudo realizado no nordeste da Tailândia, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos nas fases aguda e convalescente de uma infecção secundária por DENV, durante período no qual não havia circulação de ZIKV. O objetivo principal deste estudo foi avaliar uma possível reatividade-cruzada de anticorpos anti-DENV e anti-ZIKV, através de ensaio de neutralização em placa (PRNT) e ensaio de facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE), utilizando linhagens celulares. Os resultados demonstraram que anticorpos monoclonais isolados de pacientes infectados com DENV apresentaram reatividade cruzada com ZIKV. No entanto, poucos são neutralizantes, indicando possibilidade de ADE em uma infecção por ZIKV em indivíduos imunes ao DENV (Dejnirattisai et al. 2016).

Estudo realizado por Terzian e colaboradores analisou uma coorte de pacientes que foram previamente expostos ao DENV e mais tarde, infectados pelo DENV-2 ou pelo ZIKV. Em relação aos níveis de citocinas inflamatórias, não foi observado diferença em relação aos indivíduos imunes ao DENV e posteriormente infectados pelo ZIKV ou a outro sorotipo heterólogo ao DENV. Também não houve diferença na carga viral entre os pacientes, portanto os autores não demonstraram o fenômeno de ADE na coorte estudada (Terzian et al. 2017).

### ***1.3.2. Teoria do Pecado Antigenico Original e Tempestade de citocinas.***

O sistema imunológico é didaticamente dividido em dois ramos principais: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. As células do sistema imunológico inato são extremamente importantes para o reconhecimento rápido do agente infeccioso e essenciais para iniciar uma resposta rápida contra o patógeno. A resposta gerada inicialmente por células da imunidade inata é importante na contenção inicial da infecção, assim como no direcionamento da expansão e da diferenciação de células imunes adaptativas (linfócitos B e T). Os linfócitos T e B *naïves* respondem aos três sinais dados pelas células apresentadoras de antígenos, constituídas pela

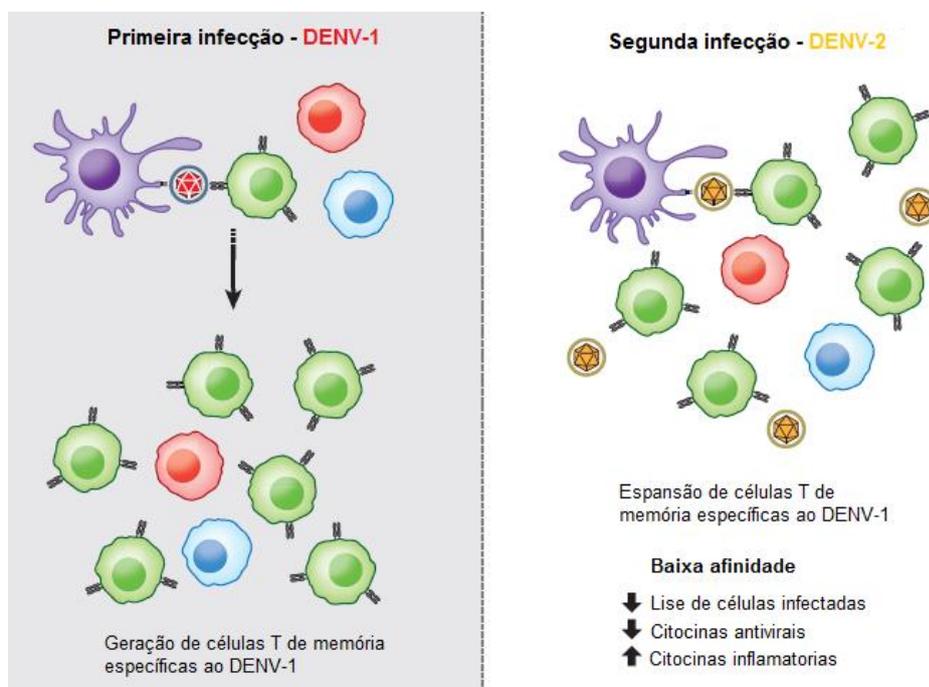
apresentação antigênica via MHC de classe II, interação com moléculas co-estimulatórias e produção/liberação de citocinas. Esses linfócitos são estimulados a proliferar e a diferenciar-se em células efetoras ou de memória (Masopust and Schenkel 2013)

Os linfócitos T e B são classicamente divididos em subpopulações funcionais e apresentam uma gama de funções características. No curso de uma infecção, a partir de um clone de células *naive* ou de células efetoras, a maioria das células efetoras vão morrer por apoptose quando o patógeno é controlado, e uma menor parte destas células darão origem as células de memória. Tanto as células efetoras, como as células de memória apresentam diferentes fatores de transcrição que levam a polarização de diferentes perfis celulares, padrões de expressão de moléculas co-estimulatórias e de receptores celulares relacionados a um padrão diferencial de migração. As células de memória são responsáveis por mediar uma resposta imune rápida e protetora em caso de reinfecção. Desta forma, a geração da memória imunológica é essencial para capacitar o sistema imunológico a responder com maior vigor e rapidez ao reencontro com o patógeno (Masopust and Schenkel 2013)

Em uma infecção primária pelo DENV, células T específicas sofrem expansão clonal apropriada, auxiliando na resolução da infecção. No entanto, quando um indivíduo é exposto a uma segunda, terceira ou quarta infecção por um sorotipo heterólogo do DENV, o fenômeno do pecado antigênico original pode ocorrer.

A teoria do Pecado Antigênico Original foi descrita em 2003 por Mongkolsapaya e colaboradores na dengue, no intuito de explicar a participação das células T de memória DENV-específicas na gravidade da doença, mais comumente observada nas infecções secundárias por sorotipos heterólogos (Mongkolsapaya et al. 2003). Assim, durante uma infecção primária ocorre expansão clonal da população de células T específicas para o sorotipo infectante. Mas, em uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo, as células T de memória específicas ao sorotipo da infecção anterior são capazes de reconhecer e de responder de forma cruzada ao sorotipo da infecção atual. Essa resposta é muito rápida em relação as células T efetoras da infecção atual. No entanto, o reconhecimento dos antígenos virais da infecção atual é de baixa afinidade. Desta forma, a resposta cruzada das células T de memória ao sorotipo viral infectante é menos eficiente e caracterizada por uma menor capacidade

citotóxica, pouco indutora de citocinas antivirais o que leva à um menor *clearance* viral, mas muito potente em relação a produção de citocinas pró-inflamatórias (Ngono and Shresta 2018) (**Figura 6**).



**Figura 6: Pecado antigênico original das células T.** O pecado antigênico original postula que as células T expostas a um primeiro vírus sofrem expansão clonal apropriada. No entanto, após nova infecção e apresentação do antígeno viral de reação cruzada, são ativadas as populações de células T previamente expandidas que têm baixa afinidade ao vírus atualmente infectante. Isso resulta em uma falha em eliminar adequadamente as células infectadas levando a respostas imunes patogênicas (Adaptado de Ngono and Shresta 2018).

Com o surgimento da epidemia de ZIKV, principalmente em regiões onde os sorotipos de DENV são endêmicos, estudos vem apontando para a reatividade-cruzada das células T entre esses vírus. Grifoni e colaboradores demonstraram que as respostas das células T da memória de indivíduos imunes ao DENV (ou por uma infecção natural ou após vacinação) reconhecem e reagem de forma cruzada com os peptídeos de ZIKV. Neste mesmo estudo, ao analisar os alvos da resposta das células T, foi observado que as proteínas estruturais do ZIKV (E, prM e C) são os principais alvos das respostas das células T CD4+ e CD8+, enquanto que para DENV essa resposta se dirige, principalmente, às proteínas não estruturais (Grifoni et al. 2017).

Principalmente por conta das citocinas pró-inflamatórias produzidas e liberadas como consequência do pecado antigênico original, é desencadeado um terceiro mecanismo envolvido com a imunopatogênese da dengue que é a “tempestade de citocinas”. O conceito geral do termo ‘tempestade de citocinas’ vem ligada a ideia de liberação excessiva ou descontrolada de citocinas pró-inflamatórias. O primeiro uso do termo ‘tempestade de citocinas’ está em um artigo publicado em 1993 sobre a doença do enxerto versus hospedeiro. Na dengue, a tempestade de citocinas está ligada a uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo, que leva à um aumento da permeabilidade vascular e por consequência, extravasamento plasmático/vascular e gravidade clínica (Tisoncik et al. 2012). Além da liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, as quimiocinas apresentam um papel importante no aumento da permeabilidade endotelial e no extravasamento plasmático (Guzman and Harris 2015) Pouco se sabe sobre a tempestade de citocinas em infecções causadas por ZIKV.

#### **1.4. Quimiocinas e seus receptores.**

##### **1.4.1. Classificação e funcionalidade.**

Quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular (7 a 15 kDa) que fazem parte da família das citocinas. Sua interação com a célula se dá via receptores de quimiocinas acoplados à proteína G ou por receptores atípicos. São conhecidas por sua alta capacidade quimiotática, responsável pela migração celular e pela residência de células imunológicas em tecidos específicos. São importantes na manutenção da homeostase e no processo inflamatório frente as infecções, podendo estar envolvidas em diversas patologias (Kufareva 2016).

Quimiocinas podem ser definidas pela sua sequência primária de aminoácidos (X) e pela disposição de resíduos de cisteína (C) na proteína. Podem ser divididas classicamente em quatro famílias: CC, CX3C, CXC e C. Além da classificação de acordo com critérios estruturais, as quimiocinas também são classificadas de acordo com sua atividade funcional principal: homeostáticas, inflamatórias ou de dupla função (mistas). Quimiocinas inflamatórias são essenciais no controle do recrutamento de leucócitos durante a inflamação, enquanto quimiocinas homeostáticas estão

envolvidas no direcionamento da migração de leucócitos durante o desenvolvimento, migração durante a resposta imune e manutenção de células imunológicas nos tecidos periféricos. Por fim, as quimiocinas de dupla função ou mistas são aquelas que compartilham funções das quimiocinas inflamatórias e das homeostáticas (Zlotnik and Yoshie 2012; Moser et al. 2004).

São descritas em torno de 50 quimiocinas e 20 receptores de quimiocinas. Há uma certa “promiscuidade” entre receptores e ligantes, ou seja, a maioria dos receptores interage com mais de uma quimiocina e a maioria das quimiocinas usa mais de um receptor (González-Motos et al 2016; López-Cotarelo et al. 2017).

Quimiocina		Receptor	células alvo																					
Nome antigo	Nome habitual		Célula dendrítica				Cél. T CD8				Cél. T CD4													
			Neutrófilo	Eosinófilo	Mastócito	Basófilo	Monócito	Céls. Langerhans	DC residente	DC migratória	DC plasmocitóide	Cél. B	Cél. plasma	Naive	Efetora	Memória	Naive	Th1	Th2	Th17	Cél. T regulatória	Cél. T folicular	NK	NKT
<b>Quimiocina CXC</b>																								
GRO $\alpha$	CXCL1	CXCR2																						
GRO $\beta$	CXCL2																							
GRO $\gamma$	CXCL3																							
ENA-78	CXCL5																							
GCP-2	CXCL6	CXCR1																						
NAP-2	CXCL7																							
IL-8	CXCL8	desconhecido																						
PF4	CXCL4	desconhecido																						
Mig	CXCL9	CXCR3																						
IP-10	CXCL10																							
I-TAC	CXCL11																							
SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCL12	CXCR7																						
BCA-1	CXCL13	CXCR5																						
BRAK	CXCL14	desconhecido																						
	CXCL16	CXCR6																						
<b>Quimiocina CC</b>																								
MCP-1	CCL2	CCR2																						
MCP-3	CCL7																							
MCP-2	CCL8	CCR5																						
MCP-4	CCL13																							
MIP-1 $\alpha$ S	CCL3																							
MIP-1 $\alpha$ P	CCL3L1																							
MIP-1 $\beta$	CCL4	CCR1																						
RANTES	CCL5																							
MPIF-1	CCL23	CCR3																						
HCC-1	CCL14																							
HCC-2	CCL15																							
HCC-4	CCL16	CCR4																						
eotaxina	CCL11																							
eotaxina-2	CCL24	CCR6																						
eotaxina-3	CCL26																							
TARC	CCL17	CCR7																						
MDC	CCL22																							
MIP-3 $\alpha$	CCL20	CCR6																						
ELC	CCL19	CCR7																						
SLC	CCL21	CCR8																						
I-309	CCL1																							
TECK	CCL25	CCR9																						
CTACK	CCL27	CCR10																						
MEC	CCL28																							
PARC	CCL18	desconhecido																						
<b>Quimiocina C</b>																								
linfotactina	XCL1	XCR1																						
SCM-1 $\beta$	XCL2																							
<b>Quimiocina CX3C</b>																								
fractalcina	CX3CL1	CX3CR1																						

**Figura 7: Quimiocinas e seus receptores.** Quimiocinas agrupadas de acordo com sua estrutura em quatro famílias distintas (em azul): C, CC, CXC e CX3C. Nomenclatura antiga e habitual, seus respectivos receptores e células imunes que expressam esses receptores. As linhas de cores verde, preto, vermelho e azul, indicam que vários ligantes podem se ligar a um único receptor de quimiocinas (adaptado de Matsushima et al. 2011).

A família de quimiocinas CXC é caracterizada pela presença de um único aminoácido entre as duas primeiras cisteínas N-terminais, enquanto os membros da classe CC não possuem esse aminoácido. As quimiocinas CXC podem ser subdivididas com base na presença de uma sequência de aminoácidos glu-leu-arg (ELR) no seu N-terminal, sendo portanto, subdivididas nas classes ELR+ e ELR- (Kiefer and Siekmann 2011). As CXC ELR+, como a CXCL8/IL-8, atraem leucócitos polimorfonucleares para sítios específicos em processos agudos de inflamação. Mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e LPS induzem a produção destas quimiocinas, tendo papel importante nas primeiras fases de cicatrização e atuando na angiogênese. O grupo ELR- atua de forma antagônica ao grupo ELR+, tendo papel angiostático. Dentre as quimiocinas angiostáticas, podemos mencionar CXCL4/PF4, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 e CXCL11/I-TAC (Santoni et al. 2014).

A família C possui um único resíduo de cisteína em sua estrutura, tendo duas quimiocinas presentes nesse grupo (XCL1 e XCL2). São secretadas por células T, NK, NKT, e particularmente são secretadas na ativação de perfil de resposta Th1. Tem um único receptor (XCR1) que é expresso em células dendríticas (Kiefer and Siekmann 2011).

A família CC é a mais numerosa e diversificada família dos quatro subgrupos definidos com base na estrutura. Nessa família, as cisteínas são diretamente justapostas (CC) e atuam em um espectro mais diversificado de células-alvo, principalmente no sistema hematopoiético, mas também em células epiteliais, células endoteliais e da musculatura lisa (Santoni et al. 2014). Alguns membros dessa família apresentam envolvimento na angiogênese, como CCL1, CCL2, CCL5, CCL11, CCL15 e CCL16 (Ridiandries et al 2016). Outros estão mais ligados à resposta inflamatória contra patógenos.

A família CX3C é composta somente por um membro, CX3CR1/Fractalcina. É a única quimiocina que possui três aminoácidos entre essas duas cisteínas é a CX3C. Apresenta-se tanto na forma ligada à membrana quanto na forma solúvel. A interação entre a fractalcina e seu receptor exclusivo (CX3CR1) induz adesão celular, quimiotaxia, rolamento de leucócitos e migração. O receptor da fractalcina CX3CR1 é expresso em monócitos/macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos (Nanki et al 2017).

#### **1.4.2. O papel de CCL5, CX3CL1 e seus receptores nos Flavivirus.**

Na dengue, um aumento da expressão de CCR5 nas células T e uma diminuição dos níveis plasmáticos de CCL5 em pacientes na fase aguda da dengue foi observado. Porém, ao analisar os tecidos hepáticos de 4 casos fatais de dengue foi encontrado uma alta frequência de células CCL5+ teciduais, indicando um provável recrutamento de células T CCR5+ da circulação para o fígado. Nossa hipótese é de que esse recrutamento poderia estar envolvido no estabelecimento de um intenso processo inflamatório tecidual (de-Oliveira-Pinto et al. 2012). Ao estudar as respostas das células T e a expressão dos receptores de quimiocinas nas infecções humanas causadas por ZIKV, DENV e na co-infecção DENV e ZIKV foi possível observar que independente do vírus, a expressão de CCR5, CX3CR1 e CXCR3 nas células T CD4 e CD8 foi similar entre os pacientes, indicando um perfil de ativação e/ou capacidade migratória dessas células (Badolato-Corrêa et al. 2018).

Nos Flavivirus, a imunidade mediada por células é crítica para contenção da infecção viral no sistema nervoso central (SNC), como visto na infecção pelo vírus do Oeste do Nilo Ocidental (WNV). Estudo utilizando camundongos selvagens C57BL/6 e os geneticamente deficientes de CCR5, os CCR5<sup>-/-</sup>, infectados com WNV, demonstrou que os camundongos CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram um aumento da morbidade e da mortalidade após infecção subcutânea com WNV. A carga viral no cerebelo dos animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados com WNV foi significativamente aumentada nos tecidos corticais, incluindo o hipocampo, no 8º dia pós-infecção. Além disso, foi observado um aumento significativo da expressão CCL3 e CCL5 no córtex de camundongos CCR5<sup>-/-</sup> infectados por WNV comparado aos animais selvagens infectados. Em conjunto, esse aumento na carga viral e na expressão de CCL5<sup>+</sup> no córtex dos animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados foram associadas a um menor infiltrado de células mononucleares e uma maior permeabilidade da barreira hematoencefálica. Esses dados indicam que as diferenças regionais na expressão de quimiocinas ocorrem em resposta à infecção por WNV do SNC e que os neurônios corticais requerem atividade do CCR5 para limitar a carga viral nessa região do cérebro (Durrant et al. 2015).

Em modelo murino de infecção pelo DENV, a inibição do CCR5 pelo Met-RANTES reduziu a carga viral e aumentou a sobrevivência dos camundongos infectados. Esse mesmo estudo demonstrou a importância do CCR5 na migração celular, e no controle da replicação e disseminação do DENV para regiões específicas. Com isso,

a inibição da interação de CCL5/RANTES com seu receptor CCR5 é um importante alvo terapêutico para a dengue (Guzman and Vazquez, 2010).

No que diz respeito ao CX3CR1, poucos estudos vêm abordando esse receptor de quimiocina nas arboviroses. Weiskopf e colaboradores avaliaram doadores saudáveis expostos ao dengue. Neste estudo, os autores puderam observar uma fração importante de células T CD4+ específicas ao DENV que expressam CX3CR1+ e que são altamente produtoras de interferon- gama (IFN- $\gamma$ ). A análise dessa subpopulação em doadores portadores do alelo de HLA-DR, relacionado a dengue branda, indicou que essas células apresentam um importante potencial citotóxico, conseqüentemente esses doadores teriam um melhor controle da infecção viral e melhor desfecho clínico (Weiskopf, D. et al. 2015).

Na infecção por ZIKV, um mecanismo observado para explicar o desenvolvimento da microcefalia é a capacidade do ZIKV infectar células progenitoras neurais humanas e de desencadear apoptose nessas células (Zhang et al. 2016). Em um estudo liderado por Mesci e colaboradores, as interações imunes de células progenitoras neurais (CPN) e macrófagos/microglia, são interações que ocorrem no cérebro em desenvolvimento de fetos/recém-nascidos infectados pela cepa brasileira do ZIKV, usando uma plataforma experimental de células-tronco pluripotentes induzidas. Os dados indicam que a microglia humana infectada com a cepa brasileira do ZIKV induz uma resposta pró-inflamatória semelhante àquela encontrada nos tecidos humanos infectados por ZIKV. É importante ressaltar que, o estudo mostrou a interação da microglia com os CPNs infectadas pelo ZIKV levando a disseminação do vírus (Mesci et al. 2018). Uma molécula importante na função homeostática da microglia é o CX3CR1, uma vez que a interação desse receptor de quimiocina com seu ligante, CX3CL1, tem sido relatada como reguladora do crescimento de axônios durante a embriogênese. Além disso, a sinalização CX3CR1 controla a densidade microglial dentro dos circuitos neurais (Pagani et al. 2015). Esses estudos demonstram a importância desses receptores de quimiocinas em infecções causadas por arbovírus, principalmente em infecções que podem levar a acometimentos neurológicos.

### **1.5. Justificativa.**

DENV e ZIKV pertencem ao mesmo gênero e a mesma família, compartilhando uma alta homologia de sequências proteicas. Os quatro sorotipos DENV compartilham aproximadamente 70% de identidade de aminoácidos entre si, enquanto o ZIKV exibe uma homologia global de 43% com DENV (com até 68% de identidade para proteínas não estruturais mais conservadas) (Lazear and Diamond 2016). Além disso, esses vírus apresentam algumas regiões endêmicas compartilhadas. Com isso surgiram questionamentos envolvendo o papel da imunidade específica na proteção ou na patogênese da infecção sequencial pelo outro flavivírus.

Estudos vem avaliando a reatividade cruzada entre DENV e ZIKV em humanos. A maioria dos estudos utilizam peptídeos sintetizados de acordo com as sequências das proteínas virais do DENV e do ZIKV. Lim e colaboradores (2018) demonstraram que 70% dos indivíduos inunes ao DENV apresentam células T capazes de reconhecer o peptídeo ZIKV NS3 *ex vivo*, indicando reatividade cruzada. Por outro lado, a reação cruzada para o peptídeo ZIKV Capsídeo foi baixa ou ausente. Além disso, os indivíduos imunes ao DENV apresentam células T CD4+ e CD8+ de memória de reação cruzada com capacidade de exercer funções efetoras antivirais contra as células infectadas *in vitro* por ZIKV, produzindo mediadores antivirais (IFN- $\gamma$ , TNF - $\alpha$ , IL-2 e granzima B) e apresentando capacidade citotóxica pelas células T CD8+. Esses resultados sugerem que, em humanos, a imunidade pré-existente de células T em relação ao DENV pode fornecer um papel imunoprotetor à infecção pelo ZIKV (Lim et al. 2018)

Outros estudos também demonstram um alto grau de reatividade cruzada entre as respostas de linfócitos T ao DENV e ao ZIKV, tanto em humanos quanto em camundongos, porém, até o momento, não foi possível estabelecer uma relação direta com um impacto negativo no desfecho da doença (Pardy and Richer 2019). Sendo necessários mais estudos para entender o real impacto da exposição prévia ao DENV na resposta imune uma infecção subsequente causada por ZIKV.

Além de da reação cruzada das células T de memória e dos anticorpos sub ou não neutralizantes, uma produção exacerbada de citocinas e quimiocinas constituem fatores envolvidos na imunopatogênese da dengue (Malavige and Ogg 2013).

Dados do nosso grupo demonstraram aumento da expressão de CCR5 nas células T e uma diminuição dos níveis plasmáticos de CCL5 em pacientes na fase aguda da dengue. Em contrapartida, encontramos uma alta frequência de células CCL5+ no tecido hepático de casos fatais por dengue, indicando recrutamento de células T CCR5+ para o fígado. A presença dessas células no tecido hepático poderia estar envolvido no estabelecimento de um intenso processo inflamatório tecidual e/ou na ativação de resposta imune antiviral (de-Oliveira-Pinto et al. 2012). Outro importante estudo demonstrou que camundongos infectados pelo DENV e tratados com o Met-RANTES, potente inibidor do CCR5, apresentaram uma carga viral reduzida e aumento de sobrevivência, indicando que a inibição da interação CCL5/RANTES com CCR5 é um importante alvo terapêutico para a dengue (Marques et al. 2015).

Até o momento, poucos estudos vêm abordando o receptor CX3CR1 na dengue. Weiskopf et al demonstraram que linfócitos T CD4+ específicos ao DENV expressam CX3CR1 e são polarizadas para uma atividade citolítica (CTL, *cytotoxic T lymphocyte*). Os autores demonstraram ainda que esses linfócitos CD4+CTL são específicos ao DENV e são mais frequentes em doadores que carregam um alelo HLA-DR protetor, o que levaria a um maior controle da infecção viral in vivo (Weiskopf D. et al. 2015). Recentemente, nosso grupo demonstrou uma frequência aumentada de linfócitos T expressando CCR5+ ou CX3CR1+ em pacientes agudos monoinfectados pelo DENV ou ZIKV e coinfectados pelo DENV/ZIKV (Badolato-Corrêa et al. 2018).

Um dado interessante publicado por Böttcher e colaboradores em um grupo de pacientes infectados cronicamente pelos vírus da hepatite B ou C (HBV ou HCV) e recuperados da infecção pelo citomegalovírus (CMV), demonstrou uma alta frequência de linfócitos T CD8+ de memória CMV-específicos CX3CR1+granzima B+perforina+, mas baixa frequência de linfócitos T efetores CD8+ HBV ou HCV-específicos CX3CR1+granzima B+perforina+. Com esses dados, os autores defendem a relevância de intervenções terapêuticas que aumentem a frequência das subpopulações CX3CR1+ para um melhor controle da infecção viral (Böttcher et al. 2015).

Nosso grupo é pioneiro no estudo de linfócitos T de memória de mulheres que foram naturalmente infectadas pelo ZIKV durante a gravidez. Portanto, esse projeto

pretende avaliar a resposta dos linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória de mulheres que foram infectadas naturalmente pelo ZIKV na gravidez, dois a três anos após infecção. Para nossas análises, as mulheres foram divididas em dois grupos: mulheres que tiveram filhos assintomáticos e mulheres que tiveram filhos sintomáticos (filhos nascidos com Síndrome congênita do Zika). As células T foram estimuladas *in vitro* com epítomos do ZIKV e a capacidade inflamatória (produção de IFN $\gamma$ ) e atividade citotóxica (expressão de CD107a que é um marcador de degranulação de células com função citotóxica) foram avaliadas. Considerando que os receptores de quimiocinas são descritos como importantes marcadores de subpopulações de células T, caracterizam diferentes perfis migratórios das células e mais recentemente, consideradas moléculas importantes no controle da carga viral e resposta imune anti-viral, nós avaliaremos, em particular, o possível envolvimento dos receptores CCR5 e CX3CR1 na resposta imune específica ao ZIKV.

## **2. Objetivos gerais e específicos.**

### **2.1. Geral:**

Avaliar os perfis inflamatório e citotóxico dos linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória de mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação, associando a funcionalidade das células T à expressão dos receptores CCR5 e CX3CR1.

### **2.2. Específicos:**

- De acordo com o desfecho clínico dos filhos, pretendemos comparar as características demográficas, clínicas, contagem de linfócitos T e exposição prévia ou não ao DENV de mulheres infectadas pelo ZIKV na gravidez, avaliadas 2 a 3 anos pós-infecção;

- Avaliar a indução da resposta imune específica ou de reação-cruzada através da medida de produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T frente a epítopos do ZIKV de diferentes grupos de doadores imunes ou não ao DENV e ou não ao ZIKV;

- Avaliar a intensidade de produção de IFN- $\gamma$  e a frequência de respondedores aos epítopos do ZIKV pelos linfócitos T de mulheres infectadas pelo ZIKV na gravidez e reagrupadas de acordo com o desfecho clínico de seus filhos;

- Avaliar a atividade citotóxica dos linfócitos T de mulheres infectadas pelo ZIKV na gravidez após estimulação *in vitro* com os epítopos de ZIKV, utilizando o marcador de degranulação CD107a;

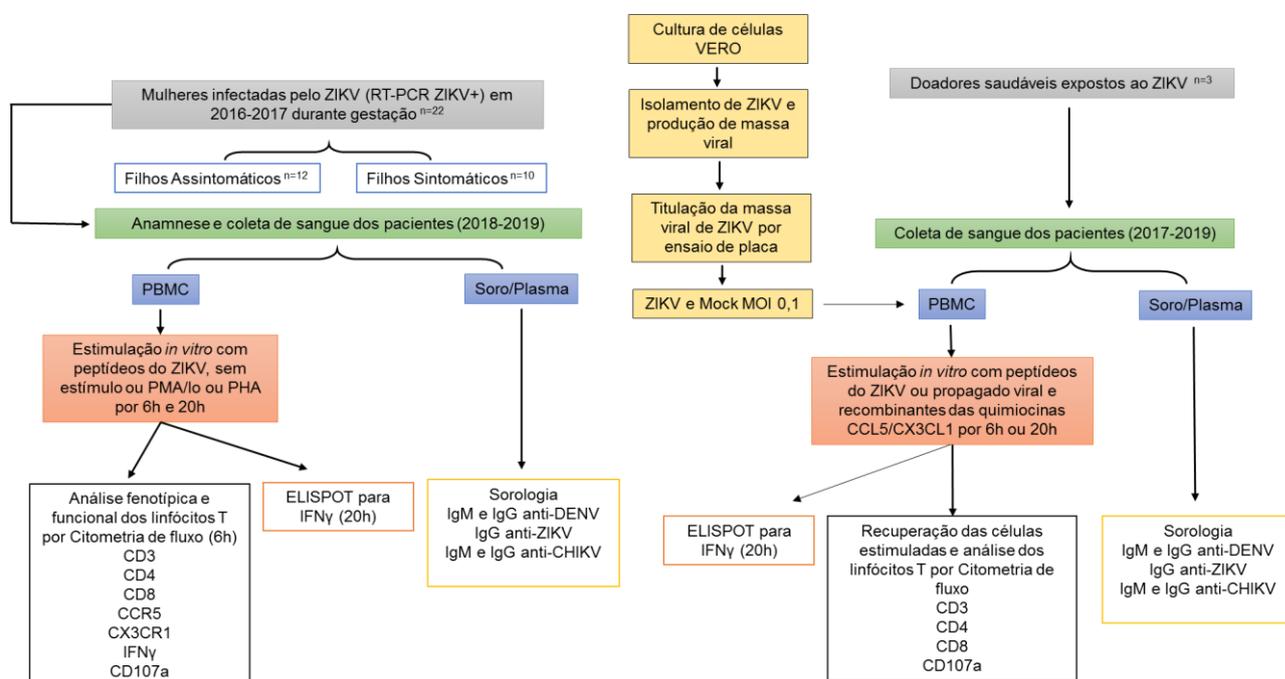
- Avaliar se há modulação da frequência de linfócitos T expressando os receptores CCR5 e CX3CR1 e se há relação da expressão desses receptores com a funcionalidade das células;

- Expandir isolados do ZIKV de pacientes brasileiros *in vitro* para ensaios futuros;

- Avaliar se a modulação da expressão de CCR5 ou de CX3CR1, seguido da estimulação *in vitro* com epítopos do ZIKV ou pelo isolado do ZIKV, influencia na capacidade de produção de IFN $\gamma$  e da citotoxicidade pelos linfócitos T.

### 3. Material e Métodos.

#### 3.1. Desenho Experimental:



#### 3.2. População de estudo.

Foram incluídas no presente estudo, 22 mulheres que foram infectadas pelo vírus zika (ZIKV) entre 2015 e 2017, durante a gravidez. Todas apresentaram erupções cutâneas, com ou sem outros sintomas sugestivos de infecção por arbovirose. Amostras de sangue e/ou urina foram coletadas na data próxima ao aparecimento do exantema e enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro (LACEN- RJ) para realização de diagnóstico diferencial molecular por PCR em tempo real (RT-qPCR) para os três arbovírus circulantes (DENV, ZIKV e CHIKV). A partir dos resultados do LACEN, foi confirmado o diagnóstico molecular de zika para todas as mulheres incluídas neste estudo.

As pacientes foram recrutadas da Unidade de Doenças Exantemáticas (UDE) do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), Universidade Federal Fluminense (UFF), situado em Niterói, RJ. O HUAP é o único centro de referência pública que atende 7 cidades na região Metropolitana II (Niterói, São Gonçalo, Maricá, Itaboraí, Tanguá, Rio Bonito e Silva Jardim) do estado do Rio de Janeiro. Durante a gravidez, foram realizadas triagens sorológicas para outros patógenos, como sífilis,

toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes vírus (STORCH). Foi também realizado teste sorológico para o antígeno viral p24 do HIV. Todas as mulheres presentes neste estudo apresentaram sorologia negativa tanto para os antígenos do STORCH, como para HIV. Mães e filhos encontram-se em acompanhamento ambulatorial pela equipe do HUAP coordenada pela Dra. Claudete Araújo Cardoso.

Devido ao acompanhamento clínico-ambulatorial realizado no HUAP, amostras de sangue vêm sendo coletadas desde 2018. Assim, neste estudo incluímos amostras coletadas nos períodos de 2018-2019, ou seja, 2 a 3 anos após a infecção pelo ZIKV. Essas amostras foram enviadas ao Laboratório de Imunologia Viral (LIV) para realização dos protocolos descritos abaixo.

Além do grupo de mulheres que foram infectadas pelo ZIKV durante a gravidez, foram incluídos somente no primeiro momento desse estudo, doadores saudáveis que nunca foram expostos ao DENV e ao ZIKV (grupo ZIKV<sup>neg</sup>/DENV<sup>neg</sup>) e doadores saudáveis que nunca foram expostos ao ZIKV mas foram expostos ao DENV (grupo ZIKV<sup>neg</sup>/DENV<sup>pos</sup>). Esses grupos foram utilizados para avaliação da resposta cruzada das células T frente a estimulação com peptídeos do ZIKV. Para o estudo da influência das quimiocinas CCL5 e CX3CL1 na funcionalidade das células T específicas ao ZIKV, foram recrutados doadores saudáveis moradores de áreas endêmicas de ZIKV e DENV, que foram expostos ao ZIKV.

### **3.3. Procedimentos éticos.**

O presente estudo é de caráter observacional, predominantemente analítico transversal, iniciado em 2018. Esta dissertação faz parte de um grande estudo intitulado: "Acompanhamento clínico de gestantes com erupção e seus filhos: estudo prospectivo coorte ". Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com o número de certificado CAAE: 56913416.9.0000.5243 e foi realizado no Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Todas as pacientes foram entrevistadas e a participação delas no estudo deu-se após conhecimento dos principais objetivos do projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.4. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por gradiente de densidade.**

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue venoso periférico de pacientes adultos, coletados em tubos com anticoagulante ACD (citrato de sódio 22,0 g/L, ácido cítrico 8,0 g/L e dextrose 24,5 g/L) (BD Vacutainer ACD Solution A). Para a separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi utilizado o gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Em um tubo cônico de 50 mL, foram adicionados 15 mL de solução gradiente Ficoll-Paque™ PLUS, seguido da adição lenta do sangue periférico sobre o gradiente. Os tubos foram centrifugados a 400 g durante 30 minutos (Centrífuga Universal 320R, Hettich Zentrifugen). Após centrifugação, o anel de PBMCs foi recuperado com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e o anel, transferido para um tubo cônico estéril de capacidade de 15 mL. As células recuperadas foram lavadas 2x em meio RPMI 1640 estéril não-suplementado (Gibco, Invitrogen). Após as lavagens, as células foram contadas e avaliadas quanto à viabilidade com o uso do corante Azul de Trypan (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, Invitrogen). Aproximadamente  $10^6$  PBMCs foram ressuspendidas em 1 mL de solução de congelamento composto por 90% de SFB inativado com 10% de Dimetil sulfosido (DMSO, Sigma), armazenados inicialmente a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24h no Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific™), Após esse período, as alíquotas foram transferidas para o nitrogênio líquido até o momento de uso.

### **3.5. Ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG anti-DENV e anti-ZIKV.**

As sorologias foram realizadas pela Dra. Monique Queiroz Lima integrante da equipe do Laboratório de Imunologia Viral.

Para a detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV foram utilizados os kits comerciais IgG anti-DENV (PANBIO, Abbott, US) por ELISA de captura e DENV IgG NS1 (EUROIMMUN, Alemanha) para verificar infecção anterior pelo DENV. Para ZIKV foram utilizados os kits comerciais ZIKV IgG (EUROIMMUN, Alemanha) e NS1 do ZIKV IgG (EUROIMMUN, Alemanha). As sorologias foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.6. Caracterização do pool de Peptídeos (*megapool*) de ZIKV.

O pool de peptídeos foi sintetizado a partir da sequência do isolado BeH818995 de ZIKV. Com auxílio de ferramentas de bioinformática foram recuperados dados de 103 sequências de proteoma da poliproteína do ZIKV de diversas localidades que apresentaram surto da doença (Canadá, África, Ásia e Américas), sendo 42 sequências provenientes das Américas. Os isolados apresentam uma alta frequência de conservação (99,2%) em todas as regiões da poliproteína viral. Além disso, as sequências de ZIKV foram comparadas com sequências de proteoma de outros Flavivirus, como a do vírus dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), sendo realizadas análises de identidade e de reação-cruzada entre sequências de ZIKV com outros Flavivirus mencionados anteriormente em relação a resposta das células T (Xu et al., 2016).

Foram realizados ensaios de predições para ligação dos peptídeos a uma ou mais das 27 variantes alélicas do HLA de classe I (A e B), escolhidas devido sua alta prevalência na população (Weiskopf, D. et al. 2013), e ensaio de predição para ligação dos peptídeos a variantes alélicas do HLA de classe II (DR) (Weiskopf, D. et al. 2016). Os *megapools* de peptídeos de ZIKV são compostos por um conjunto de peptídeos de 9 e 10-mer contendo todas as regiões da poliproteína viral (C, prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B e NS5) juntamente com um conjunto de peptídeos de 15-mer, sobrepostos por 10 resíduos de aminoácidos de toda a poliproteína viral (**Tabela 1**). Portanto, os *megapools* de peptídeos do ZIKV utilizados neste estudo são direcionados tanto para linfócitos T CD8+ quanto para linfócitos T CD4+.

Os *megapools* de ZIKV foram definidos segundo percentuais de identidade de aminoácidos (ID) entre DENV e ZIKV: (i) ZIKV<sup>int</sup> com %ID de 70-79% (similaridade intermediária) e (ii) ZIKV<sup>low</sup> com %ID de 58-69 (considerados com baixa similaridade) (Xu et al., 2016)

No presente estudo, foram utilizados dois dos *megapools* de peptídeos ZIKV acima mencionados, o ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>. Os *megapools* foram gentilmente cedidos por nossos colaboradores, Drs. Alessandro Sette e Daniela Weiskopf do La Jolla Institute for Allergy & Immunology (LJI, CA, USA).

**Tabela 1:** Constituição dos *megapools* de peptídeos de ZIKV.

Alelo	Número de peptídeos positivos para:												
	C	pr	M	E	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	2K	NS4B	NS5	Total
Conjunto previsto de peptídeos de ZIKV composto por peptídeos de 9 e 10mer													
HLA-A*01:01	0	10	5	21	6	8	6	21	4	0	17	38	136
HLA-A*02:01	7	0	6	20	3	23	5	17	10	3	26	16	136
HLA-A*02:03	9	0	6	16	3	23	8	20	9	4	23	15	136
HLA-A*02:06	4	2	2	14	6	25	5	17	17	6	25	13	136
HLA-A*03:01	12	4	4	11	10	17	4	22	5	0	8	39	136
HLA-A*11:01	14	6	2	11	9	6	7	23	6	0	11	41	136
HLA-A*23:01	5	2	4	20	7	7	1	21	7	0	21	41	136
HLA-A*24:02	4	3	4	16	5	9	2	16	7	0	24	46	136
HLA-A*26:01	6	5	1	15	6	10	15	16	9	3	17	33	136
HLA-A*30:01	9	3	1	18	16	8	3	26	3	0	10	39	136
HLA-A*30:02	1	10	5	17	11	2	8	24	1	0	21	36	136
HLA-A*31:01	10	3	8	8	18	11	2	25	1	0	5	45	136
HLA-A*32:01	6	3	6	21	9	18	6	16	7	1	11	32	136
HLA-A*33:01	9	1	5	6	15	12	3	22	2	0	5	56	136
HLA-A*68:01	9	4	5	12	13	8	3	35	3	0	7	37	136
HLA-A*68:02	7	5	5	17	6	11	7	18	8	5	22	25	136
HLA-B*07:02	4	2	6	12	15	16	5	35	6	2	11	22	136
HLA-B*08:01	11	4	2	13	13	16	0	24	10	0	7	36	136
HLA-B*15:01	4	7	7	18	6	12	7	17	6	1	23	28	136
HLA-B*35:01	4	5	3	14	5	12	9	23	7	2	26	26	136
HLA-B*40:01	2	4	4	17	17	4	8	25	10	0	6	39	136
HLA-B*44:02	1	4	1	15	18	3	7	32	7	0	5	43	136
HLA-B*44:03	3	3	2	14	20	3	7	33	7	0	4	40	136
HLA-B*51:01	4	0	8	13	6	19	9	17	9	5	17	29	136
HLA-B*53:01	6	3	2	18	13	12	6	18	8	2	17	31	136
HLA-B*57:01	3	5	4	15	16	12	3	13	4	0	13	48	136
HLA-B*58:01	7	1	5	17	16	14	3	11	5	0	11	46	136
Total	161	99	113	409	288	321	149	587	178	34	393	940	3672
Peptídeos 15mer abrangendo a poliproteína ZIKV													
HLA classe II	25	18	15	100	70	46	26	123	25	5	50	180	683

### 3.7. Estimulação *in vitro* dos linfócitos T com Megapools de ZIKV.

As PBMCs foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e lavadas em meio RPMI 1640 para retirada da solução de congelamento. Em seguida, 2 x 10<sup>6</sup> PBMC por mL foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 1% HEPES, 1% L-glutamina, 1% Penicilina/estreptomicina. Cerca de 2x10<sup>5</sup> PBMC em 100µL foram cultivadas em placas de 96 com fundo em U (Costar) em triplicatas em meio RPMI na presença ou não de estímulos. Dentre os estímulos, foram adicionados 50 µL de (i) *megapools* de peptídeos de ZIKV<sup>LOW</sup> ou (ii) ZIKV<sup>INT</sup> (1 µg/mL, A & A, San Diego, CA) ou (iii) PMA (acetato de miristato de forbol, 50 µg/mL, um ativador da proteína C quinase) e ionomicina (50µg/mL, um ionóforo de cálcio). PMA/Iono foram utilizados como controle positivo da estimulação *in vitro*. Para marcação intracelular por citometria de fluxo, essa estimulação foi durante 6 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Nas últimas 4 horas de incubação, foi adicionado 50 µL de brefeldina A (10µg/mL, um inibidor do transporte de proteínas do aparelho de Golgi para o retículo endoplasmático).

### **3.8. Marcação Extracelular e Intracelular por Citometria de Fluxo.**

Após 6h de estimulação *in vitro*, as PBMCs cultivadas em triplicatas foram ressuspensas e reunidas em um único poço das placas de 96 com fundo em U (Costar). A placa foi centrifugada a 555x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado por versão de placa e as células ressuspensas em 150 µL de solução de lavagem (BSA 1%, NaN<sub>3</sub> 0,1% em PBS pH 7,4). A placa foi centrifugada novamente a 555x g, 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, foram adicionados 20 µL por poço da mistura contendo anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos diluídos em solução de lavagem para marcadores extracelulares (**Tabela 2**). Após adição da mistura de anticorpos monoclonais, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo de luz. Ao final da incubação, foram adicionados 100-150 µL da solução de lavagem para duas lavagens sequenciais. Após a última lavagem, as células foram fixadas com 100 µL da solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) por 15 minutos a 4°C, seguido de lavagem com PBS pH 7,4 para retirada do PFA. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS pH 7,4 e mantidas a 4°C no abrigo de luz *overnight*.

No dia seguinte, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 150 µL de solução de permeabilização (0,15% Saponina, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> em PBS pH 7,4) e novamente centrifugadas a 555 x g por 5 minutos. No pellet de células foram adicionados 100 µL da solução de bloqueio (10% plasma humano inativado, 0,15% Saponina, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> em PBS pH 7,4) com incubação por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 20 µL do anticorpo monoclonal anti-IFN-γ diluído em solução de permeabilização, seguindo de incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Passados os 30 minutos, a placa foi lavada com 100 µL por poço da solução de permeabilização. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspenso e lavado duas vezes com a solução de permeabilização. Após essas lavagens, as células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em PBS e transferidas para tubos de citometria. As células foram mantidas a 4° C ao abrigo de luz até a aquisição imediata no FACS ARIA BD (Plataforma de Citometria – PDTIS - FIOCRUZ) e as análises foram feitas utilizando o software FlowJo 10.5.2 (Tree Star1).

As respostas das células T frente a estimulação *in vitro* com os *megapools* de peptídeos ZIKV<sup>low</sup> ou frente a estimulação *in vitro* com os *megapools* de peptídeos ZIKV<sup>int</sup>, foram analisadas juntas, visto que o objetivo era avaliar a resposta das células T frente a estimulação com os *megapools*. Sendo assim, não foram incluídas análises comparativas de resposta das células T frente ao megapool ZIKV<sup>low</sup> e frente ao megapool ZIKV<sup>int</sup> separadamente.

A apresentação dos dados de produção intracelular do IFN- $\gamma$  dentro das células T CD4+ e CD8+ após estimulação *in vitro* com os *megapools* de ZIKV foram subtraídos dos valores obtidos das culturas de células em meio RPMI.

Foram considerados indivíduos “respondedores” aqueles cuja razão ou índice de estimulação da produção de IFN- $\gamma$  com *megapools* de ZIKV foi dividido da produção de IFN- $\gamma$  basal (estimulação detectada nas culturas em meio RPMI) foi  $\geq 2$ .

#### Respondedores

$$\frac{\%CD4+ \text{ ou } CD8+IFN-\gamma+ \text{ após } megapools \text{ de ZIKV}}{\%CD4+ \text{ ou } CD8+ IFN-\gamma+ \text{ em meio de cultura}} \geq 2$$

**Tabela 2:** Anticorpos monoclonais utilizados na marcação extracelular por Citometria de fluxo.

Alvo	Fluorocromo	Clone	Empresa	Catálogo
IFN- $\gamma$	FITC	4S.B3	eBiosciense	11-7319-82
CD4	PE	SK3	BD	347327
CD8	PE-Texas Red	3B5	Invitrogen	MHCD0817
CX3CR1	PECy7	2A9-1	Biolegend	341612
CD3	AF-700	UCHT1	BD	557943
CD107a	APC Cy7	H4A3	Biolegend	328630
CCR5	Pacific Blue	J418F1	Biolegend	359124

### **3.9. Ensaio de *EliSpot* para detecção de células produtoras de *IFN-γ*.**

Conforme a indicação do fabricante, a placa de *EliSpot* (MultiScreen HTS, Millipore, Burlington, MA, USA) foi pré-ativada com álcool 35% por 1 minuto em ambiente estéril seguido de 5 lavagens com PBS pH 7,4. Após as lavagens, foi adicionado anticorpo de captura anti-*IFN*γ (clone 1-DK1; Mabtech, Nacka Strand, Sweden) a 2,5 µg/mL e a placa foi incubada por 12-16 horas a 4°C. Após incubação com o anticorpo de captura, foram realizadas 3 lavagens utilizando PBS estéril. Em seguida, foi realizado bloqueio com meio RPMI 1640 suplementado contendo 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 1% Tampão HEPES e 1% L-glutamina, seguido de incubação por 2h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o meio foi removido por versão de placa e adicionado 100 µL/poço dos seguintes estímulos: (i) megapool de peptídeos ZIKV<sup>LOW</sup> (1 µg/mL A&A, San Diego, CA); (ii) megapool de peptídeos ZIKV<sup>INT</sup> (1 µg/mL – A&A, San Diego, CA); (iii) mitógeno PHA (5µg/mL) como controle positivo. No poço com os estímulos, foi adicionado 100 µL/poço da suspensão de células (2-2,5x10<sup>5</sup> células/100 µL/poço). A placa foi incubada por 20 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, em condições não estéreis, foram realizadas 3 lavagens com 200 µL/poço de PBS. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo de detecção biotinizado anti-*IFN*-γ (clone 7-B6-1; Mabtech) a 1 µg/mL em solução diluente (1% SFB em PBS) seguido de incubação por 3 horas na estufa à 37°C. Após incubação, a placa foi novamente lavada 4 vezes com 200 µL/poço de PBS e foi adicionado 100 µL/poço de estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (SA-ALP - Mabtech) diluída 1:1000 em solução diluente com incubação de 1 hora a 37°C. A partir desta etapa, a placa foi protegida da exposição à luz. A placa foi lavada 4 vezes com 200 µL/poço de PBS, e adicionado 50µL/poço da solução reveladora NBT/BCIP (Ready to use – Sigma - B3804). A reação foi parada com água corrente após visualização dos spots na membrana. Em seguida, o resíduo da solução reveladora foi removido batendo firmemente a placa sobre papel absorvente. A membrana inferior da placa foi removida e a placa contendo os spots foi colocada para secar no escuro à temperatura ambiente até a leitura. As leituras foram realizadas no equipamento ImmunoSpot S6UV Ultra (ImmunoSpot1S6UV Ultra, Cleveland, OH, USA) na Plataforma de *EliSpot* – PDTIS-Fiocruz.

Assim como nos ensaios de citometria de fluxo, as respostas das células T frente a estimulação *in vitro* com os *megapools* de peptídeos ZIKV<sup>low</sup> ou frente a estimulação *in vitro* com os *megapools* de peptídeos ZIKV<sup>int</sup>, foram analisadas juntas, visto que o objetivo era avaliar a resposta das células T frente a estimulação com os *megapools*. Sendo assim, não foram incluídas análises comparativas de resposta das células T frente ao *megapool* ZIKV<sup>low</sup> e frente ao *megapool* ZIKV<sup>int</sup> separadamente.

Para obter o valor da produção de IFN- $\gamma$  pelas PBMCs é realizada uma média das triplicatas e depois o resultado dessa média é normalizado para que os resultados sejam apresentandos como a quantificação do número de células secretoras de citocinas, no caso IFN- $\gamma$ , ou spot forming cell (SFC) por 10<sup>6</sup> PBMC.

Média das triplicatas x 5 = valor final normalizado

Os valores de SFC produzidos após estimulação com os *megapools* de ZIKV *in vitro* é resultado da subtração dos valores encontrados nas culturas celulares não-estimulados (apenas com meio de cultura).

Foram considerados indivíduos “respondedores” aos *megapools* de ZIKV aqueles que apresentaram valores  $\geq 20$  SFC após subtração dos valores obtidos nas culturas não-estimuladas. Para os poços estimulados com o mitógeno PHA, são considerados imunocompetentes aqueles indivíduos que apresentaram  $\geq 50$  SFC após cálculo no qual foram subtraídos valores dos SFC das culturas não-estimuladas.

### **3.10. Ensaio de bloqueio com recombinantes das quimiocinas CCL5 e CX3CL1 e com anticorpos anti-CCL5 e anti-CX3CL1.**

Inicialmente, nós fomos avaliar se a presença de proteínas recombinantes humanas (rh) dos ligantes CCL5 e CX3CL1 ou o uso de anticorpos bloqueadores anti-CCL5 e anti-CX3CL1 nas culturas eram capazes de modular a expressão dos receptores CCR5 e CX3CR1 nos linfócitos T de doadores saudáveis. Para isso, 2 x 10<sup>5</sup> PBMC foram plaqueadas em placas de 96 com fundo em U (Costar) em um volume de 50 $\mu$ L em triplicatas na presença ou não de: (i) rh CCL5/RANTES (100ng/mL, Biolegend CNS, Inc, San Diego, CA, USA); (ii) rh CX3CL1/Fractalcina (100ng/mL, Biolegend CNS, Inc, San Diego, CA, USA); (iii) anticorpo bloqueador anti-CCL5/RANTES (10 ug/mL, R&D System, Inc, Minneapolis, MN, USA); (iv) anticorpo

bloqueador anti-CX3CL1/Fractalcina (10 ug/mL) (R&D System, Inc, Minneapolis, MN, USA); (v) controle isotípico IgG (10 ug/mL, BioLegend, San Diego, CA) durante 20 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (**Quadro 1**). Após incubação, as PBMC foram centrifugadas a 555 x g por 5 minutos (Universal 320R, Hettich Zentrifugen). As células foram ressuspensas em solução de lavagem (BSA 1%, NaN<sub>3</sub> 0,1% em PBS pH 7,4) e as triplicatas foram reunidas em um único poço. As células foram marcadas com um conjunto de anticorpos monoclonais (**Tabela 3**) expressos na superfície das células. O processo de marcação extracelular foi descrito no item 3.8.

**Quadro 1:** Esquema de cultura de PBMCs com recombinantes de quimiocinas ou com anticorpos anti-quimiocinas

Estímulo	Bloqueio	Tempo de incubação	Metodologia
Meio de cultura	Anticorpo Anti-CCL5 (10 ug/mL)	20 h	Citometria de fluxo
Meio de cultura	rh CCL5 (100ng/mL)		
Meio de cultura	rh CX3CL1 (100ng/mL)		
Meio de cultura	Anticorpo Anti-CX3CL1 (10 ug/mL)		

**Tabela 3:** Anticorpos monoclonais utilizados na marcação extracelular por Citometria de fluxo.

Alvo	Fluorocromo	Clone	Empresa	Catálogo
CD4	PE	SK3	BD	347327
CD8	PE-Texas Red	3B5	Invitrogen	MHCD0817
CX3CR1	PECy7	2A9-1	Biolegend	341612
CD3	AF-700	UCHT1	BD	557943
CCR5	Pacific Blue	J418F1	Biolegend	359124

### 3.11. Efeito do bloqueio da expressão de CCR5 e CX3CR1 na produção de IFN- $\gamma$ e expressão de CD107a após estimulação com o isolado de ZIKV ou megapools do ZIKV

Toda parte descrita no **item 3.9**, referente a metodologia de EliSpot foi realizada até adição da solução de bloqueio. A partir daí, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço dos estímulos (esquema abaixo) e em seguida, 100  $\mu$ L/poço da suspensão de  $2 \times 10^5$  células. Para realização da detecção de produção de IFN $\gamma$  por EliSpot, a placa foi incubada por 20 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. O esquema da cultura é descrito abaixo (**Quadro 2**):

**Quadro 2:** Esquema de cultura de PBMCs com recombinantes de quimiocinas, ZIKV e MOCK

Estímulo	Bloqueio	Tempo de incubação	Metodologia	Recuperação de células
Mock	-	20 h	EliSpot	Citometria de fluxo
Mock	rh CCL5 (100ng/mL)			
Mock	rh CX3CL1 (100ng/mL)			
ZIKV MOI 0,1	-			
ZIKV MOI 0,1	rh CCL5 (100ng/mL)			
ZIKV MOI 0,1	rh CX3CL1 (100ng/mL)			

Após incubação, em condições não estéreis, as células foram recuperadas nas 3 lavagens com 200  $\mu$ L/poço de PBS e transferidas para tubos para realização da marcação extracelular por citometria de fluxo, como descrito no item 3.8. As células recuperadas foram marcadas com o painel de anticorpos descrito **tabela 4**. Um esquema semelhante de estimulação (**Quadro 3**) foi realizado utilizando-se *megapools* ZIKV<sup>low/int</sup> em placa de 96 poços para cultura celular. Nesse momento do estudo, as células foram estimuladas na presença dos dois *megapools* de peptídeos de ZIKV (ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>), sem ser realizada estimulações separadas para cada peptídeo.

**Quadro 3:** Esquema de cultura de PBMCs com recombinantes de quimiocinas e *megapool* de ZIKV

Estímulo	Bloqueio	Tempo de incubação	Metodologia
Meio de cultura	-	6 h	Citometria de fluxo
Meio de cultura	rh CCL5 (100ng/mL)		
Meio de cultura	rh CX3CL1 (100ng/mL)		
<i>Megapool</i> ZIKV	-		
<i>Megapool</i> ZIKV	rh CCL5 (100ng/mL)		
<i>Megapool</i> ZIKV	rh CX3CL1 (100ng/mL)		

**Tabela 4:** Anticorpos monoclonais utilizados na marcação extracelular por Citometria de fluxo

Alvo	Fluorocromo	Clone	Empresa	Catálogo
CD4	FITC	Multiclone (Leu-3 <sup>a</sup> -3b)	BD	347413
CD8	PE-Texas Red	3B5	Invitrogen	MHCD0817
CD3	AF-700	UCHT1	BD	557943
CD107a	APC Cy7	H4A3	Biologend	328630

### 3.12. Manutenção da cultura de células VERO.

A linhagem celular VERO é originada de células renais de primata *Cercopithecus aethiops* (Macaco-Verde Africano) e utilizada no presente estudo para isolamento e propagação do ZIKV assim como para a titulação do propagado por *Plaque Assay*. A cultura de células VERO foi mantida a 37°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% CO<sub>2</sub> em Meio 199 (Gibco, Invitrogen Corporation) suplementado com 10% SFB, 2,5% Hepes (Gibco, Invitrogen Corporation), 1% L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corporation), 0,1% fungizona e 3% bicarbonato de sódio em frascos para cultura de células (T-25) (Corning, Life Science) até atingirem 90-95% de confluência.

Após atingir a confluência pretendida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril ou DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco, Invitrogen

Corporation) e posteriormente descoladas das garrafas de cultura utilizando solução de 0,25% Tripsina e 0,2g/L EDTA (Ultrapure 0,5 EDTA pH 8,0, Invitrogen – Life technologies). A ação da Tripsina/EDTA é neutralizada com Meio 199 suplementado com 10% de SFB a temperatura ambiente. As células soltas eram recolhidas das garrafas e transferidas para um tubo cônico estéril de 15 mL, seguido de centrifugação a 230 x g durante 5 minutos (Universal 320R, Hettich Zentrifugen). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi desfeito e diluído em 1mL de Meio 199 suplementado. Em 5mL de Meio 199 suplementado com 10% SFB, 500 µL da suspensão celular era adicionada em garrafa estéril (T-25) para manutenção das culturas de células VERO.

O Meio 199 suplementado foi trocado a cada 2 dias e eram realizadas passagens semanais a fim de manter as melhores condições para o desenvolvimento e manutenção das células.

### ***3.13. Propagação do ZIKV.***

A propagação do isolado ZIKV ES29116 (isolado de um paciente oriundo do Espírito Santo durante epidemia de 2015) foi realizada em cultura de células da linhagem VERO que apresentavam 90- 95% de confluência nas últimas 48 horas. Foram utilizadas duas garrafas pequenas (T25), uma para a propagação do ZIKV e outra sem o vírus para preparação do Mock. Em ambas as garrafas, o Meio 199 foi descartado e as monocamadas de células VERO foram submetidas à duas lavagens com PBS ou DPBS estéreis. Após as lavagens, em uma das garrafas foi adicionar 100 µL do isolado viral ZIKV ES29116 e na outra garrafa foi adicionado mesmo volume de Meio 199 (Mock). A alíquota do isolado viral foi gentilmente cedida pelo Dr. Alex Pauvolid do Laboratório de Flavivírus chefiado pela Dra. Ana Bispo, IOC/Fiocruz. Em seguida, foi realizada incubação por 1 hora a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, com leve agitação a cada 10 minutos, para adsorção viral. Ao final deste período, foram adicionados 5 mL de Meio 199 suplementado com 2% SFB em cada garrafa. A monocamada foi observada diariamente a fim de detectar possível efeito citopático causado pela propagação viral. No 3º dia pós-infecção, foi observado efeito citopático. As células e o sobrenadante foram coletados e centrifugados a 370 x g por 7 minutos à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e o pellet descartado. Foi adicionado

20% de SFB no sobrenadante contendo o propagado viral e foram feitas 20 alíquotas contendo 200 µL cada. As alíquotas foram armazenadas a -70°C.

#### ***3.14. Extração de RNA do propagado de ZIKV nas células VERO utilizando o kit QIAamp® VIRAL RNA.***

A extração do RNA viral foi realizada com o QIAamp® VIRAL RNA kit (Qiagen, Alemanha) dentro da capela para manipulação de RNA seguindo as recomendações do fabricante. Cerca de 140µL do propagado viral e controle Mock foram inicialmente lisados sob condições desnaturantes para inativar RNases e garantir o isolamento do RNA viral. As condições tamponantes foram ajustadas para proporcionar a ligação do RNA com a membrana de sílica presente na coluna. As amostras do propagado viral e do mock foram adicionadas a coluna que foi posteriormente centrifugada. O RNA se ligou à membrana, e os contaminantes foram lavados utilizando dois tampões de lavagem diferentes (Buffer AW1 e AW2). RNA foi eluído em 60µL com tampão isento de RNase (Buffer AVE). Os 60 µL de RNA extraído foram armazenados a -70°C.

#### ***3.15. Detecção do RNA ZIKV por PCR em Tempo Real.***

Para a confirmação da pureza do propagado viral, foram realizados diferentes ensaios de RT-PCR contendo pares de iniciadores e sondas específicas para os DENV (Johnson et al. 2005); ZIKV (Lanciotti et al. 2008), CHIKV (Lanciotti et al. 2007) e YFV (Domingo et al. 2012).

A técnica de PCR em tempo real (PCR) utilizando o sistema Taqman® foi realizada em uma plataforma em Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Termofisher Scientific). As reações do PCR foram preparadas em um local fisicamente separado e todo o protocolo de biossegurança e de boas práticas no laboratório foi seguido. As reações foram realizadas em duplicata utilizando Superscript III Platinum One Step qRT-PCR (Invitrogen). Foi utilizado o controle negativo da reação (NTC, non template control), contendo água, e uma amostra sabidamente negativa.

### **3.16. Titulação da massa viral por Plaque Assay**

O ensaio de placa (*Plaque Assay*) foi a metodologia utilizada para quantificar o propagado viral. Para o ensaio, em placas de 6 poços foram cultivadas  $6 \times 10^5$  células VERO/poço. As placas cujas células apresentaram confluência de 90-95% foram utilizadas após 48 horas. A alíquota do isolado de ZIKV foi submetida a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) em seistuplicatas. Após a inoculação, as células foram submetidas à incubação por 1h em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , com leve agitação a cada 15 minutos, para melhor adsorção viral. Durante o período de incubação, foi preparado o primeiro overlay que é composto pelo Meio 199 suplementado (5% SFB, 2,5% HEPES, 1% L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% fungizona e 3% bicarbonato de sódio) com adição de 1% de agarose. O overlay foi mantido em banho maria a  $42^{\circ}\text{C}$  até seu uso para evitar solidificação. Após o período de adsorção viral, foi adicionado 3 mL do overlay em cada poço contendo as monocamadas celulares, mantido a temperatura ambiente até a sua solidificação. Após esse período, as placas foram incubadas em estufa a 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 dias.

As plaques foram observadas diariamente até a visualização de áreas descoloridas, característica de destruição celular causada por unidades formadoras de placas (PFU, proveniente do inglês *plaque-forming unit*). As monocamadas receberam uma segunda camada da mesma solução de overlay, desta vez contendo o corante vermelho neutro, e foram novamente incubadas por 24h.

As áreas onde ocorreu efeito citopático (plaque) ficaram brancas. Considera-se que cada plaque é originada de uma partícula viral infectiva. Cada plaque observada por poço foi contada e calculada a média de plaques por diluição. Com base nas médias obtidas foram selecionadas as duas diluições que apresentaram  $\geq 10$  PFU. O cálculo realizado para obter o título do propagado viral é descrito abaixo.

Utilizando o ZIKV nas diluições de  $10^{-9}$  a  $10^{-1}$ , efetuou-se o seguinte cálculo:

- 1° Foi calculado a média do número de placas encontrado por diluição
  - 2° Foi escolhida duas diluições que apresentavam médias  $\geq 10$  plaques
  - 3° Foi calculado a média de plaques obtido nas duas diluições selecionadas
- Para cálculo do título em PFU:

Valor obtido no item 3° x 100 $\mu\text{l}$  (volume utilizado para a inoculação viral) x  $10^x$  (diluição) = PFU/mL

MOI é o índice de multiplicidade de infecção sendo a razão de agentes (vírus) para alvos de infecção (célula).

O cálculo do MOI do propagado viral foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{MOI} = \frac{\text{PFU/mL} \times \text{Volume}}{\text{Número de células que serão infectadas}}$$

### **3.17. Análise estatística.**

As diferenças entre os grupos de pacientes recrutados com relação aos dados demográficos foram feitas pelo teste Mann-Whitney. Para a análise dos dados obtidos pelo EliSpot foi utilizado o Teste Mann-Whitney e Teste exato de Fisher. Para a Citometria de fluxo foram utilizados os seguintes testes: teste Wilcoxon, Teste de Mann Whitney e Teste Friedman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O software utilizado para a análise foi GraphPad PRISM (version 5) (GraphPad Software).

## **4. Resultados**

### **4.1. Dados clínicos dos pacientes infectados pelo ZIKV durante a gravidez**

Neste estudo foram incluídas 22 mulheres, cujo diagnóstico laboratorial foi confirmado por RT-PCR como infecção pelo ZIKV durante a gravidez no período de 2016-2017. Essas mulheres junto de seus filhos, vem sendo acompanhados pela Unidade de Doenças Exantemáticas do HUAP. Nosso estudo avaliou as células obtidas nas coletas de sangue que ocorreram entre 2018-2019, ou seja, 2 a 3 anos após a infecção aguda pelo ZIKV.

Essa coorte foi classificada de acordo com o desfecho clínico da criança ao nascimento. O primeiro grupo foi constituído por 12 mulheres que tiveram filhos assintomáticos, ou seja, crianças que foram expostas ao ZIKV por transmissão vertical, mas as crianças não apresentaram alterações clínicas, radiológicas ou neurológicas. O segundo grupo foi composto por 10 mulheres que tiveram filhos com características clínicas da Síndrome Congênita do Zika (SCZ). As crianças diagnosticadas com SCZ apresentaram duas ou mais das seguintes anormalidades: alterações neurológicas (confirmadas por ressonância magnética), neuroanatômicas e neurossensoriais, visuais ou auditivas e funcionais, como irritabilidade, disfagia e espasmos (Brasil, P. et al. 2016)

Iniciamos nossas análises comparando a média das idades das mulheres nos anos de 2018 e 2019, momento em que o sangue foi coletado. Como visto, não foi observado diferença estatística significativa entre a média de idades entre os grupos

No momento do atendimento laboratorial em 2016-2017, todas as mulheres apresentaram erupções cutânea (rash) em diferentes trimestres de gravidez. Entre o grupo de mulheres que tiveram filhos assintomáticos, uma (8%) mulher foi infectada no 1º trimestre da gestação, 9 (75%) foram infectadas no 2º trimestre e duas (17%) mulheres foram infectadas no 3º trimestre da gestação. No grupo de mulheres que tiveram filhos com SCZ, 3 (30%) foram infectadas no 1º trimestre, 5 (50%) no 2º trimestre e uma (10%) no 3º trimestre gestacional. De forma surpreendente, uma (10%) mulher foi detectado o ZIKV 94 dias antes da data da última menstruação. De acordo com esses dados, independente do desfecho clínico do bebê, a maioria das mulheres foram infectadas no 2º trimestre da gravidez (**Tabela 5**).

Outros sintomas foram relatados durante a infecção pelo ZIKV, destacamos artralgia, febre, dor de cabeça, mialgia e hiperemia conjuntival. No grupo de mulheres que tiveram filhos assintomáticos, 9 (75%) delas apresentaram artralgia, 5 (42%) apresentaram febre, 4 (33%) mialgia, 3 (25%) dor de cabeça e duas (17%) apresentaram hiperemia conjuntival. No grupo de mulheres que tiveram filhos nascidos com SCZ, 3 (30%) mulheres apresentaram artralgia, 3 (30%) mialgia, duas (20%) febre, duas (20%) dor de cabeça e duas (20%) apresentaram hiperemia conjuntival (**Tabela 5**).

Em relação ao desfecho clínico dos filhos, dentro do grupo de crianças com SCZ, podemos observar que 3 (30%) crianças tem microcefalia e todas (100%) apresentam alteração neurológica (**Tabela 5**). As impressões neurológicas são avaliadas através de exame DENVER, que é um teste que rastreia alguns riscos no desenvolvimento infantil, incluindo avaliação de comportamento social, linguagem e habilidades motoras preconizadas como típicas do período de desenvolvimento. Esse teste é o mais utilizado no Brasil, sendo empregado também em diversos países (Brito et al. 2011). Outras complicações relatadas foram alterações oftalmológicas (20%), disfagia (70%), alterações ortopédicas (55%), incluindo alguns casos de artrogripose e alterações auditivas (16%).

**Tabela 5:** Características das gestantes infectadas pelo ZIKV e de seus filhos expostos ao ZIKV durante a epidemia em 2016 e 2017.

	Mulheres Sintomáticas RT-PCR ZIKV + na gestação (2016-2017) <sup>n= 22</sup>	
	Filhos Assintomáticos <sup>n= 12</sup>	Filhos Sintomáticos <sup>n= 10</sup>
<b>Idade (anos)<sup>a</sup></b>	29,8±7	31,8± 9,5
<b>Trimestre gestacional do aparecimento do rash, n (%)</b>		
1°	1 (8)	3 (30)
2°	9 (75)	5 (50)
3°	2 (17)	1 (10)
Antes da gestação	0 (0)	1 (10)
<b>Presença dos sintomas, n (%)</b>		
Febre	5 (42)	2 (20)
Dor de cabeça	3 (25)	2 (20)
Mialgia	4 (33)	3 (30)
Artralgia	9 (75)	3 (30)
Hiperemia conjuntival	2 (17)	2 (20)
<b>Desfecho da criança no nascimento, n (%)</b>		
Assintomáticos	12 (100)	0 (0)
Microcefalia	0 (0)	3 (30)
Síndrome congênita do zika	0 (0)	10 (100)
Impressões neurológicas	0 (0)	10 (100)

média ± desvio padrão<sup>a</sup>

As estatísticas foram realizadas pelo Prism 6.0. Teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, p<0,05.

#### **4.2. Detecção de anticorpo IgG anti-ZIKV nas mulheres convalescentes que foram infectadas durante a gravidez por ZIKV.**

A detecção de anticorpos contra a imunoglobulina G (IgG) específica para ZIKV e DENV foi determinada pelo ensaio de imunoabsorção ligado à enzima de captura (ELISA) comercial nas amostras de sangue coletadas entre 2018 e 2019. Das 22 mulheres testadas, 18 (82%) delas tem detecção de IgG anti-ZIKV, 14 (64%) tem detecção de IgG anti-DENV e em apenas 4 (18%) não foi detectado IgG anti-ZIKV (**Tabela 6**).

Com os dados de detecção de IgG anti-DENV e anti-ZIKV foi possível separar quatro grupos: IgG anti-DENV positivo/IgG anti-ZIKV negativo, IgG anti-DENV

positivo/IgG anti-ZIKV positivo, IgG anti-DENV negativo/IgG anti-ZIKV positivo e IgG anti-DENV negativo/IgG anti-ZIKV negativo. **Independente do desfecho clínico da criança, foi observado uma maior frequência de mulheres (em torno de 60%), que apresentam anticorpos IgG anti-DENV positivo/IgG anti-ZIKV positivo.**

Dentro do grupo de mães que tiveram filhos assintomáticos, foi possível observar que 4 (33%) mulheres apresentaram anticorpos IgG anti-ZIKV, mas não apresentavam anti-DENV e em uma (8%) não foi detectado anticorpos IgG para nenhum dos dois vírus. Dentro do grupo de mães que tiveram filhos acometidos com SCZ, uma delas (10%) apresentou somente anticorpos IgG anti-ZIKV, uma (10%) apresentou anticorpos IgG anti-DENV, mas não apresentou anti-ZIKV e em duas (20%) não foram detectados anticorpos IgG anti-DENV nem anti-ZIKV.

**É necessária a realização de outros ensaios sorológicos para determinar se os anticorpos anti-ZIKV detectados estão associados à atividade neutralizante através do ensaio de neutralização de placa (PRNT). Além disso, determinar a especificidade ou a reatividade cruzada desses anticorpos.**

**Tabela 6:** Características das gestantes convalescentes infectadas pelo ZIKV recrutadas de 2018 a 2019

Mulheres Sintomáticas RT-PCR ZIKV + na gestação (2015-2017) <sup>n= 22</sup>		
	Filhos Assintomáticos <sup>n= 12</sup>	Filhos Sintomáticos <sup>n= 10</sup>
<b>Positividade de IgG, n (%)</b>		
anti-DENV IgG+/ anti-ZIKV IgG-	0 (0)	1 (10)
anti-DENV IgG+/ anti-ZIKV IgG+	7 (58)	6 (60)
anti-DENV IgG-/ anti-ZIKV IgG+	4 (33)	1 (10)
anti-DENV IgG-/ anti-ZIKV IgG-	1 (8)	2 (20)
<b>Frequência de células T, n (%)<sup>a</sup></b>		
Células T CD4	61,5 (58,9-68,0)	57,6 (51,2-60,1)
Células T CD8	21 (19,1-24,1)	26,9 (24,3-25,5)*
Razão CD4/CD8	3,0 (2,5-3,5)	2,1 (1,9-2,4) <sup>#</sup>

mediana (25 – 75 interquartil)<sup>a</sup>

As estatísticas foram realizadas pelo Prism 6.0. Teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney,  $p < 0,05$ .

Outra avaliação realizada foi a medida da frequência das subpopulações de células T através da metodologia de citometria de fluxo. Os dados de frequência de células T CD4 e CD8 e a razão entre as duas subpopulações é apresentado na tabela acima (**Tabela 6**). Não foi observado diferença significativa nas frequências de células T CD4 entre os grupos. No entanto, foi observado **uma maior frequência de células T CD8 no grupo de mulheres que tiveram filhos nascidos com SCZ quando comparado ao grupo de mulheres que tiveram filhos assintomáticos** ( $p < 0,0242$ ). Como esperado, ao analisarmos a razão da frequência de linfócitos T CD4 sobre linfócitos T CD8, observamos que o grupo de mães que tiveram bebês com SCZ apresentam uma razão CD4/CD8 menor comparada as que tiveram bebês assintomático ( $p < 0,0152$ ).

#### **4.3. Produção de IFN $\gamma$ dos linfócitos T de indivíduos expostos ao ZIKV após estimulação *in vitro* com epítomos do ZIKV.**

A partir deste ponto, concentramos na análise das respostas das células T de mulheres que foram infectados pelo ZIKV. Neste experimento, incluímos também indivíduos que nunca tiveram ZIKV ou DENV (ZIKV<sup>neg</sup>DENV<sup>neg</sup>) e doadores expostos ao DENV (DENV+), a fim de avaliar uma possível resposta cruzada aos peptídeos do ZIKV. Inicialmente, a resposta *ex vivo* das células do sangue aos epítomos ZIKV<sup>Low/Int</sup> foi medida através da produção de IFN- $\gamma$  através do ensaio EliSpot.

Inicialmente avaliamos a imunocompetência das células do sangue de todos os grupos de doadores estudados através da estimulação com o ativador policlonal (mitógeno), voltado principalmente para os linfócitos T, a fitohemaglutinina (PHA). Apenas uma doadora infectada pelo ZIKV na gravidez e que teve bebê assintomático apresentou valor de SFC após estimulação com PHA  $< 100$  e índice de estimulação  $< 0$  (SFC do meio foi de 203 SFC e do PHA 90 SFC), indicando algum imunocomprometimento. Todos os demais doadores apresentaram valores de SFC  $> 800$  após PHA e índices de estimulação  $> 2$ . Assim, com exceção de uma doadora, todos os indivíduos participantes deste estudo são imunocompetente (**Figura 8 A**).

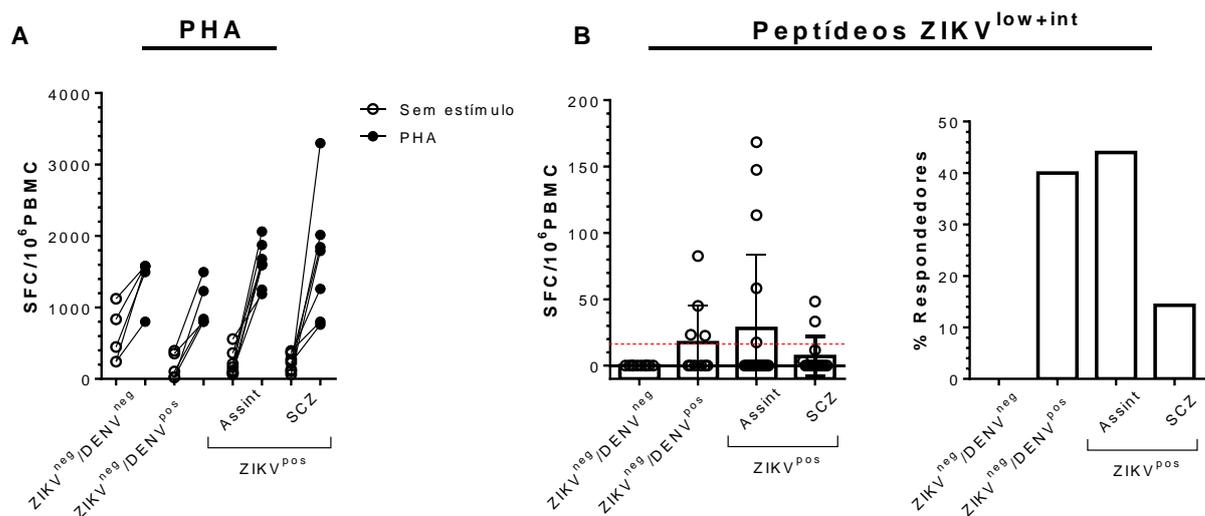
Ao avaliar a produção de IFN- $\gamma$  após estimulação com o *megapool* ZIKV<sup>Low/Int</sup>, confirmamos que todos os 5 doadores considerados não expostos nem ao ZIKV nem

ao DENV (ZIKV<sup>neg</sup>DENV<sup>neg</sup>), não responderam aos estímulos com o *megapool* ZIKV<sup>Low/int</sup> (Figura 8 B e C).

No entanto, a média de SFC do grupo de 10 doadores que já tiveram infecção pelo DENV ao longo da vida, mas nunca foram expostos ao ZIKV (amostras anteriores a 2013) foi de 17,3 (desvio padrão de  $\pm 27,6$ ). De acordo com a referência utilizada para classificar os doadores como “respondedores” (ver Materiais e Métodos), nós observamos que um mesmo doador respondeu tanto ao ZIKV<sup>low</sup> como ao ZIKV<sup>int</sup> e 2 diferentes doadores responderam apenas ao ZIKV<sup>int</sup>. Assim, tivemos 4 (40%) respondedores DENV+ (e ZIKV<sup>neg</sup>) aos *megapools* ZIKV<sup>Low</sup> e/ou ZIKV<sup>Int</sup> e portanto, caracterizando a resposta cruzada aos peptídeos ZIKV<sup>low/int</sup>.

Por fim, avaliamos os dois grupos de mulheres infectadas pelo ZIKV na gravidez. Relembrando que em aproximadamente 60% delas também foram detectados anticorpos anti-DENV, indicando imunidade prévia ao DENV. A média de SFC do grupo das 9 mães que tiveram bebês assintomáticos foi de 28,1 ( $\pm 55,6$ ). Duas delas responderam ao peptídeo ZIKV<sup>Low</sup> e outras duas responderam ao ZIKV<sup>int</sup>, totalizando 4 (44%) diferentes mães respondedoras a algum dos peptídeos do ZIKV. No grupo de mães que tiveram bebês com SCZ, a média de SFC foi de 6,9 ( $\pm 15,0$ ) e das 7 mães avaliadas, apenas uma (7,1%) delas respondeu tanto ao peptídeo ZIKV<sup>low</sup> como ao ZIKV<sup>int</sup>.

Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos, porém, nossos dados confirmam dados anteriores sobre a reatividade-cruzada de peptídeos do ZIKV em indivíduos imunes ao DENV, mas não ao ZIKV. Das 16 mães estudadas, 5 delas responderam aos peptídeos do ZIKV, indicando que >30% delas apresentaram respostas de células T para ZIKV. Todas as 5 mães tiveram IgG anti-ZIKV detectável e 3 delas eram também IgG anti-DENV positivo. ***Em relação ao desfecho clínico dos bebês, embora sem significância estatística, é possível observar que mães de crianças assintomáticas apresentam uma tendência a uma magnitude maior de resposta com produção de IFN- $\gamma$ , assim como uma frequência maior de respondedores em relação as mães de bebês com SCZ.*** Esses dados precisam ser confirmados utilizando outros peptídeos derivados do ZIKV.



**Figura 8: Resposta aos megapools de peptídeos derivados de ZIKV em diferentes grupos de doadores.** A resposta das células T foi avaliada pela medida da produção de IFN- $\gamma$  através do ensaio de EliSpot. A figura mostra doadores não expostos nem ao ZIKV, nem ao DENV (ZIKV<sup>neg</sup>/DENV<sup>neg</sup>, n= 5), doadores expostos ao DENV, mas não ao ZIKV (ZIKV<sup>neg</sup>/DENV<sup>pos</sup>, n=5), doadores expostos ao ZIKV (ZIKV<sup>pos</sup>) que inclui mulheres expostas ao vírus durante a gravidez que tiveram filhos assintomáticos (n= 9) ou sintomáticos com SCZ (n= 7). Em (A), a resposta das células T à estimulação por PHA e em (B) a magnitude da reatividade das células T aos megapools ZIKV (a apresentação demonstra o dobro de pontos, porque foram testados ZIKV<sup>Low</sup> e ZIKV<sup>Int</sup>). As respostas foram expressas como o número de células secretoras de IFN- $\gamma$  por 10<sup>6</sup> PBMC. (C) Percentual de indivíduos "respondedores" cujo valor de SFC/10<sup>6</sup> PBMC foi  $\geq$  20 SFC após 20 h de estimulação *in vitro* com peptídeos do ZIKV. As análises estatísticas foram avaliadas utilizando o teste Kruskal-Wallis test. A significância estatística para diferenças na frequência de "respondedores" foi realizada usando teste Fisher.

#### 4.4. Detecção de células T produtoras de IFN- $\gamma$ específicas aos megapools de ZIKV pelo ensaio de marcação intracelular de citocinas (ICS).

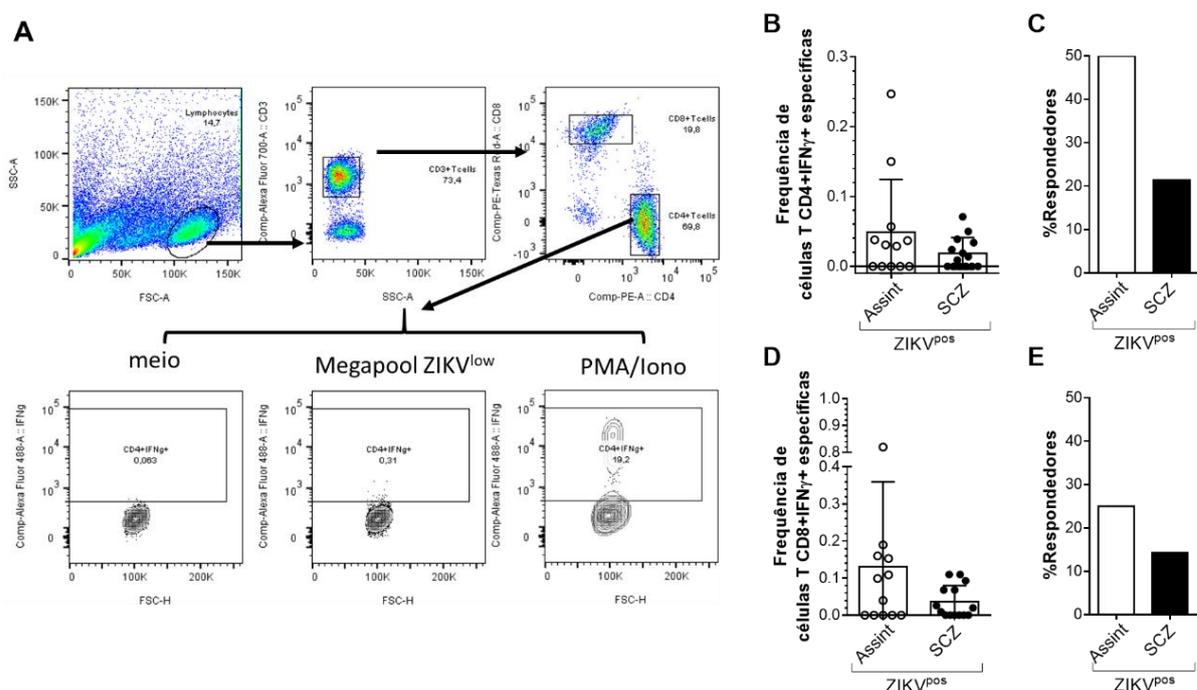
A partir das análises dos dados pelo ensaio de EliSpot, avaliamos pelo ensaio de marcação intracelular de citocinas (ICS) a resposta específica aos epítomos de ZIKV<sup>Low/Int</sup> das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quanto à produção de IFN- $\gamma$ , apenas no grupo de mulheres expostas ao vírus durante a gravidez que tiveram filhos assintomáticos (n= 6) ou sintomáticos com SCZ (n= 7). A estratégia da *gate* foi demonstrada na **Figura 9 A**.

A média da magnitude da resposta das células T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> específicas aos epítomos de ZIKV<sup>Low/Int</sup> do grupo das mães que tiveram bebês assintomáticos foi de 0,05 ( $\pm$  0,08), enquanto das mães que tiveram bebês com SCZ foi de 0,02 ( $\pm$  0,02) (**Figura 9 B**). Em relação à resposta das células T CD4<sup>+</sup>, 6 (50%) das mães testadas com bebês assintomáticos e 3 (21,4%) das mães testadas com bebês com SCZ foram

consideradas respondedores aos *megapools* ZIKV<sup>Low</sup> e/ou ZIKV<sup>Int</sup> (Figura 9 C). ***Embora sem significância estatística, foi possível observar que tanto em relação a magnitude da resposta, como em relação a frequência de respondedores, os megapools de ZIKV induzem maior resposta das células T CD4+IFN-γ+ específicas em mulheres com filhos assintomáticos do que naquelas mães que tiveram filhos com SCZ.***

Para a resposta das células T CD8+IFN-γ+ específicas aos epítomos de ZIKV<sup>Low/Int</sup>, a média da magnitude da resposta do grupo das mães que tiveram bebês assintomáticos foi de 0,13 (± 0,23) e das mães que tiveram bebês com SCZ foi de 0,04 (± 0,04) (Figura 9 D). Em relação à resposta das células T CD8+, apenas 3 (25%) das mães testadas com bebês assintomáticos e duas (14,3%) das mães com bebês com SCZ foram consideradas respondedores aos *megapools* ZIKV<sup>Low</sup> e/ou ZIKV<sup>Int</sup> (Figura 9 E). ***Desta forma, foi possível observar que em relação a magnitude da resposta das células T CD8+IFN γ+ específicas, os megapools de ZIKV induzem resposta similar a resposta das células T CD4+IFN-γ+ específicas em mulheres com filhos assintomáticos e naquelas com filhos com SCZ. Em relação a frequência de respondedores, observamos uma tendência de maior percentual de respondedoras dentro do grupo de mães que tiveram bebês assintomáticos quando comparado com o grupo de mães que tiveram filhos com SCZ. Porém observamos um menor percentual de mulheres respondedoras em ambos os grupos para as células T CD8 quando comparado as células T CD4.***

Em resumo, das 13 mães estudadas, 9 (69,2%) delas apresentaram células T IFN-γ+ específicas após estímulo com os *megapools* de ZIKV. Das mães respondedoras, curiosamente duas delas foram IgG anti-ZIKV<sup>negativo</sup>/anti-DENV<sup>negativo</sup>, as demais foram anti-ZIKV<sup>positivo</sup> com anti-DENV<sup>positivo</sup> ou negativo (dado não demonstrado).



**Figura 9: Detecção de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$ .** Dados apresentados de mulheres com doença sintomática infectadas pelo ZIKV (RT-PCR ZIKV+) durante gestação em 2016-2017. (A) indica estratégia de análise por citometria de fluxo.  $10^6$  PBMC/mL foram cultivadas por 6h (com adição de brefeldina nas últimas 4h) nas seguintes condições: meio de cultura (não-estimulada), epítomos do ZIKV (ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>) ou mitógeno PMA/Ionomicina. (B) Cada ponto representa o valor % CD4+ (D) e CD8+ produtores de IFN $\gamma$  após estimulação com *megapools* de ZIKV subtraído do meio de cultura. Em (C e E) são demonstrados os percentuais de “respondedores”, ou as mães que têm células T CD4+ (C) e CD8+ (E) que responderam aos *megapools* de ZIKV. Os gráficos representam dados de mulheres que tiveram filhos assintomáticos (n=6, [12 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]) ou com SCZ (n=7, [14 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]). As análises estatísticas foram avaliadas utilizando o Mann-Whitney test. A significância estatística para diferenças na frequência de "respondedores" foi realizada usando teste Fisher

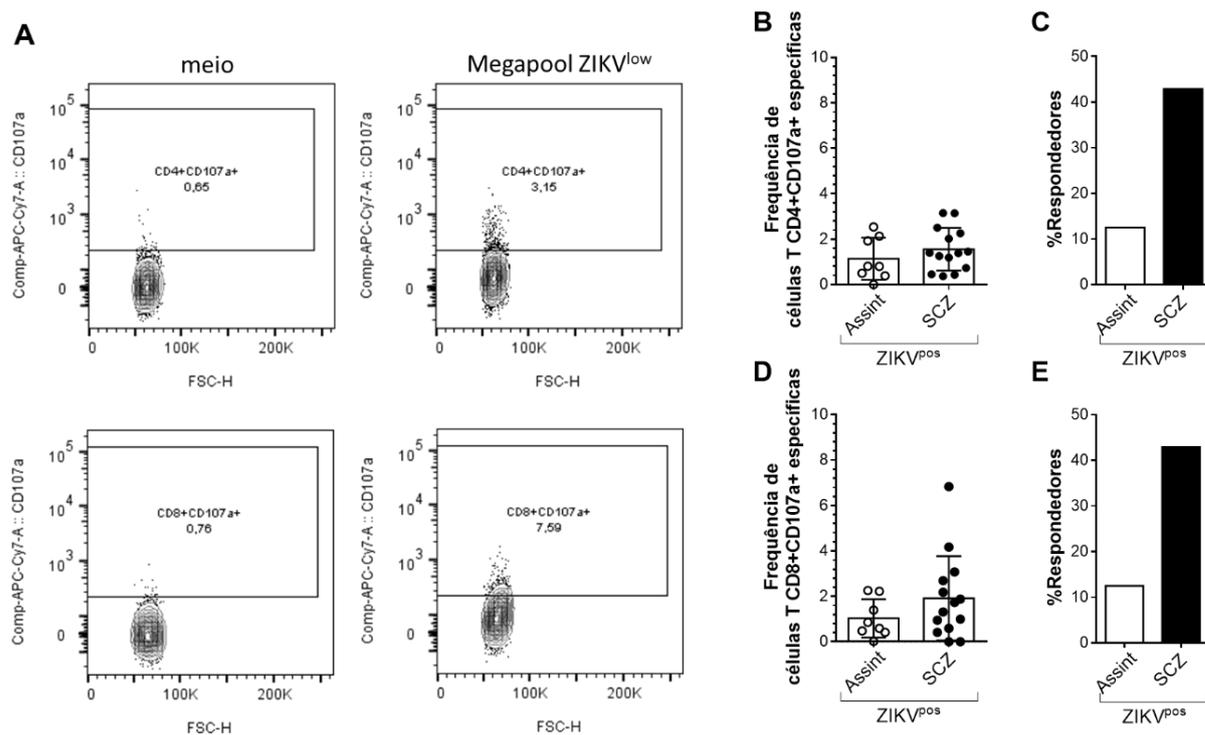
#### 4.5. Avaliação da atividade citotóxica de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de mulheres expostas ao ZIKV.

Após as análises da produção de IFN- $\gamma$ , avaliamos se as células T CD4+ e CD8+ frente aos epítomos do ZIKV são capazes de liberar seus grânulos citotóxicos através da marcação extracelular da proteína 1 da membrana associada ao lisossomo (LAMP-1, *lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) ou CD107a. Essa análise também foi feita apenas no grupo de mulheres expostas ao vírus durante a gravidez que tiveram filhos assintomáticos (n= 4) ou sintomáticos com SCZ (n= 7). A estratégia da *gate* foi demonstrada na **Figura 10 A**.

Inicialmente, a média da magnitude da resposta das células T CD4+CD107a+ específicas aos epítomos de ZIKV<sup>Low/Int</sup> do grupo das mães que tiveram bebês assintomáticos foi de 1,1 ( $\pm$  0,9), enquanto das mães que tiveram bebês com SCZ foi de 1,6 ( $\pm$  0,9) (**Figura 10 B**). Em relação à resposta das células T CD4+, apenas uma (12,5%) das mães testadas com bebês assintomáticos e 6 (42,9%) das mães testadas com bebês com SCZ foram consideradas respondedores aos megapools ZIKV<sup>Low</sup> e/ou ZIKV<sup>Int</sup> (**Figura 10 C**). ***Embora sem significância estatística, foi possível observar que a magnitude da resposta das células T CD4+CD107a+ específicas e a frequência de respondedores aos megapools de ZIKV<sup>Low</sup> e/ou ZIKV<sup>Int</sup> foi maior nas mães com filhos com SCZ comparado àquelas com filhos assintomáticos. Essa resposta foi inversa ao observado nas células T CD4+IFN- $\gamma$ + específicas aos epítomos de ZIKV<sup>Low/Int</sup>.***

Para a resposta das células T CD8+CD107a+ específicas aos epítomos de ZIKV<sup>Low/Int</sup>, a média da magnitude da resposta do grupo das mães que tiveram bebês assintomáticos foi de 1,0 ( $\pm$  0,8) e das mães que tiveram bebês com SCZ foi de 1,9 ( $\pm$  1,9) (**Figura 10 D**). Em relação à resposta das células T CD8+, apenas uma (12,5%) das mães testadas com bebês assintomáticos e 6 (42,9%) das mães testadas com bebês com SCZ foram consideradas respondedores aos megapools ZIKV<sup>Low</sup> e/ou ZIKV<sup>Int</sup> (**Figura 10 E**). ***Desta forma, foi possível observar que em relação a magnitude da resposta e da frequência de respondedores, os megapools de ZIKV<sup>Low/Int</sup> induzem uma maior resposta nas mães com filhos com SCZ do que em relação as mães com filhos assintomáticos. Diferente da resposta das células T CD8+IFN- $\gamma$ +, observamos um percentual muito maior de respondedores.***

Em resumo, das 11 mães estudadas, 6 (54,5%) delas apresentaram células T CD107a+ específicas após estímulo com os megapools de ZIKV. Das mães respondedoras, curiosamente uma delas foi IgG anti-ZIKV<sup>negativo</sup>/anti-DENV<sup>negativo</sup>, as demais foram anti-ZIKV<sup>positivo</sup> com anti-DENV<sup>positivo</sup> (dado não demonstrado).

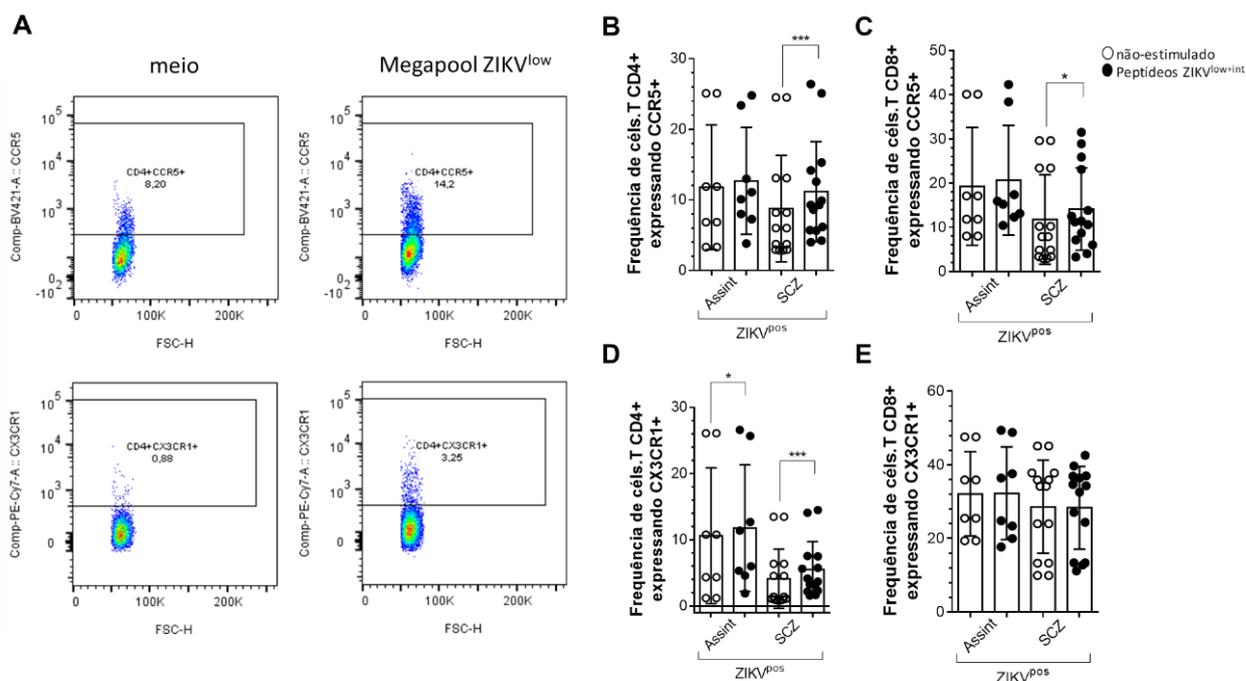


**Figura 10: Detecção de células T CD4+ e CD8+ com atividade citotóxica. Dados apresentados de mulheres com doença sintomática infectadas pelo ZIKV (RT-PCR ZIKV+) durante gestação em 2016-2017. (A)** indica a estratégia de análise por citometria de fluxo.  $10^6$  PBMC/mL foram cultivadas por 6h (com adição de brefeldina nas últimas 4h) nas seguintes condições: meio de cultura (não-estimulada), epítomos do ZIKV (ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>) ou mitógeno PMA/Ionomomicina. **(B)** Cada ponto representa o valor % CD4+ **(D)** e CD8+ expressando CD107a após estimulação com *megapools* de ZIKV subtraído do meio de cultura. Em **(C e E)** são demonstrados os percentuais de “respondedores”, ou as mães que têm células T CD4+ **(C)** e CD8+ **(E)** que responderam aos *megapools* de ZIKV. Os gráficos representam dados de mulheres que tiveram filhos assintomáticos (n=4, [8 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]) ou com SCZ (n=7, [14 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]). As análises estatísticas foram avaliadas utilizando o Mann-Whitney test. A significância estatística para diferenças na frequência de "respondedores" foi realizada usando teste Fisher.

#### 4.6. Expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 dos linfócitos T após estimulação *in vitro* com epítomos do ZIKV.

Além de avaliar a produção de IFN- $\gamma$  e a citotoxicidade pelas células T, avaliamos a frequência de expressão de CCR5 e o CX3CR1, dois receptores de quimiocinas que distinguem subpopulações de células T e que influenciam no perfil de migração e na funcionalidade das células que as expressam. Em relação a frequência das células T expressando CCR5, observamos que **após estimulação com os megapools de ZIKV, apenas as mães que tiveram filhos com SCZ aumentaram a frequência das**

**células T CD4+CCR5+** (em meio  $8,8 \pm 7,5$  versus após *megapool* ZIKV  $11,2 \pm 7,1$ ) (Figura 11 B) e **T CD8+CCR5+** (em meio  $11,8 \pm 10,1$  versus após *megapool* ZIKV  $14,1 \pm 8,3$ ), **mas as mães com filhos assintomáticos, não** (Figura 11 C). No que diz respeito a frequência das **células T expressando CX3CR1**, **tanto no grupo de mães que tiveram bebês assintomáticos** (em meio  $10,6 \pm 10,2$  versus após *megapool* ZIKV  $11,8 \pm 9,5$ ) **como no grupo de mães com bebês com SCZ (em meio  $4,1 \pm 4,5$  versus após *megapool* ZIKV  $5,5 \pm 4,2$ )**, observamos um aumento da frequência de células **TCD4+CX3CR1+** após estimulação com os *megapools* de ZIKV (Figura 11 D). No entanto, **nenhuma diferença foi vista após estimulação com os *megapools* de ZIKV nas células T CD8+CX3CR1+** (Figura 11 E).



**Figura 11: Linfócitos T expressando CCR5 e CX3CR1 após estimulação *in vitro* com epítomos ZIKV.** Mulheres sintomáticas infectadas pelo ZIKV (RT-PCR ZIKV+) durante gestação nas epidemias de 2016-2017. Gráficos representam dados das PBMCs dessas pacientes obtidas em 2018. **(A)** Figura representativa da marcação de CCR5 e CX3CR1 nos linfócitos T CD4+ e CD8+ de um paciente sem estimulação e após *megapools* de ZIKV.  $10^6$  PBMC/mL foram cultivadas por 6h (com adição de brefeldina por 4h) nas seguintes condições: meio de cultura (não-estimulada), mitógeno PMA/Ionomomicina ou epítomos do ZIKV (ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>). Cada ponto representa o valor % CD4 **(B)** e CD8 **(C)** expressando CCR5+ ou CX3CR1+ **(D-E)** após estimulação com *megapools* de ZIKV ou sem estimulação. Os gráficos representam dados das pacientes que tiveram filhos assintomáticos (n=4, [8 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]) e sintomáticos (SCZ, n=7, [14 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]). Após estimulação, as PBMCs foram coradas com uma mistura de anticorpos anti- CD3, CD4, CD8, CCR5, CX3CR1, CD107a e IFN- $\gamma$ . O teste estatístico *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* foi aplicado e valor  $p < 0,05$  foram considerados estatísticos.

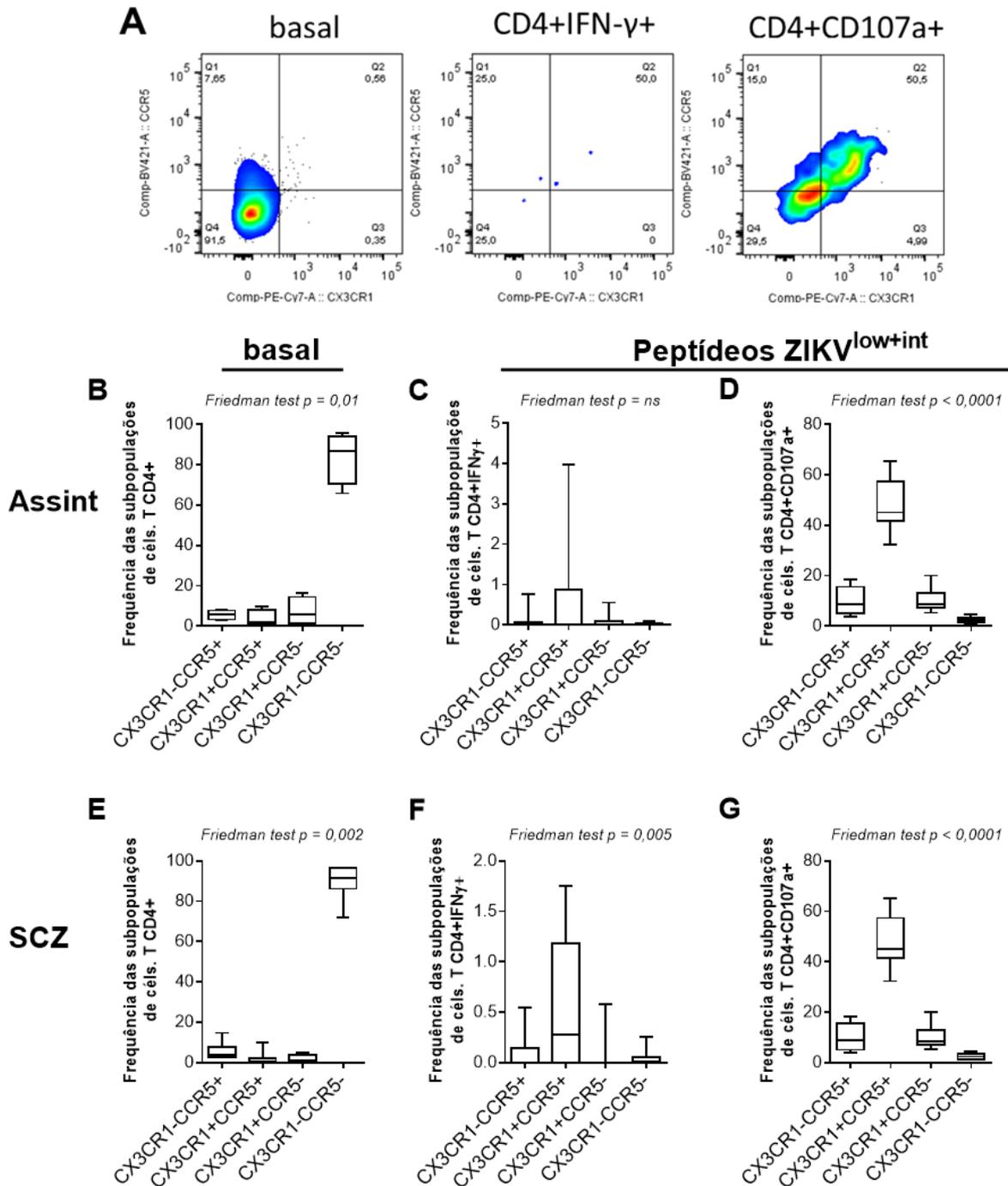
#### **4.7. Associação do perfil inflamatório e citotóxico de linfócitos T expressando CCR5 e/ou CX3CR1 após estimulação *in vitro* com epítomos do ZIKV.**

Baseado nos dados anteriores, nossa pergunta nesta etapa do trabalho é saber se a funcionalidade das células T CD4+ e CD8+ quanto à produção de IFN- $\gamma$  e atividade citotóxica está relacionada ou não à expressão de CCR5 e/ou CX3CR1.

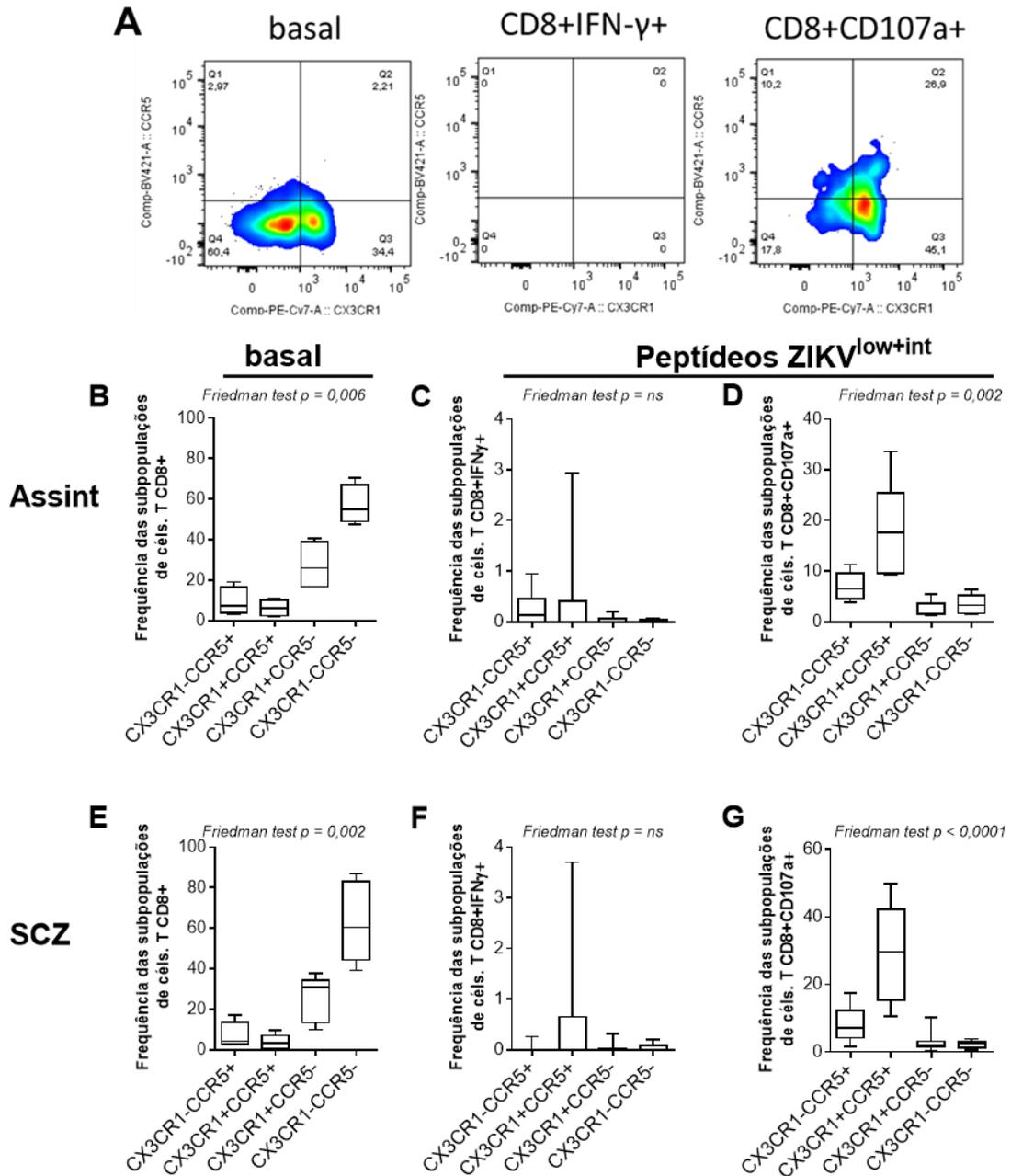
Para isso, inicialmente na região das células T em condições basais, avaliamos a frequência de 4 subpopulações celulares baseado na expressão ou não de CCR5 e CX3CR1. As análises demonstram que nos dois grupos de mães, independente do desfecho clínico de seus filhos, as células T CD4+ são predominantemente CCR5-CX3CR1-.

Após estimulação com os *megapools* de ZIKV, foram selecionadas as regiões funcionais, ou seja, as CD4+IFN- $\gamma$ + e as CD4+CD107a+. Como demonstrado, em ambos os grupos de mães, as células T CD4+IFN- $\gamma$ + são predominantemente as subpopulações CCR5+CX3CR1+. No caso das células T CD4+CD107a+, estas também são predominantemente CCR5+CX3CR1+ em ambos os grupos estudados (**Figura 12**).

O mesmo tipo de análise foi feito para as células T CD8+. Primeiramente, a região das células T CD8+ foi selecionada. Dentro dela, observamos um predomínio de células CCR5-CX3CR1-, seguido das CX3CR1+CCR5- em ambos os grupos de mulheres, independente do desfecho clínico de seus filhos. Após estimulação com os *megapools* de ZIKV, foram selecionadas as regiões CD8+IFN- $\gamma$ + e as CD8+CD107a+. De acordo com as análises, não foi possível detectar qual (is) subpopulações quanto à expressão ou não de CCR5 e/ou CX3CR1 estão as IFN- $\gamma$ +. Semelhante as CD4+CD107a+, as CD8+CD107a+ são predominantemente CCR5+CX3CR1+ em ambos os grupos de mães estudados (**Figura 13**).



**Figura 12: Subpopulações de Linfócitos T CD4+, CD4+IFN- $\gamma$ + e CD4+CD107a+ de acordo com a expressão de receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 seguido ou não da estimulação *in vitro* com epítopos ZIKV. (A) Estratégia de análise da coexpressão ou não de CCR5 e/ou CX3CR1 dentro das subpopulações CD4+, CD4+IFN- $\gamma$ + e CD4+CD107a+ por citometria de fluxo. Cerca de 106 PBMC/mL foram cultivadas por 6h (com adição de brefeldina por 4h) nas seguintes condições: não-estimulada, PMA/Ionomicina ou epítopos do ZIKV (ZIKV<sup>low/int</sup>). (B) Frequência basal de células T CD4+ que expressam CCR5 e/ou CX3CR1 na condição não-estimulada em mulheres que tiveram filhos assintomáticos. Neste mesmo grupo de mães, foram selecionadas células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  (C) e as CD4+CD107a+ (D) após estimulação com *megapools* de ZIKV (n=4, [8 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]) e as células T analisadas segundo coexpressão ou não de CCR5 e/ou CX3CR1. (E-G) Mesmo tipo de análise foi realizada em mulheres que tiveram filhos com SCZ (n=7 [14 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]). As análises estatísticas foram realizadas com o teste Friedman**



**Figura 13: Subpopulações de Linfócitos T CD8+, CD8+IFN- $\gamma$ + e CD8+CD107a+ de acordo com a expressão de receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1 seguido ou não da estimulação *in vitro* com epítomos ZIKV. (A) Estratégia de análise da coexpressão ou não de CCR5 e/ou CX3CR1 dentro das subpopulações CD8+, CD8+IFN- $\gamma$ + e CD8+CD107a+ por citometria de fluxo. Cerca de 10<sup>6</sup> PBMC/mL foram cultivadas por 6h (com adição de brefeldina por 4h) nas seguintes condições: não-estimulada, PMA/Ionomomicina ou epítomos do ZIKV (ZIKV<sup>low</sup>/Int). (B) Frequência basal de células T CD8+ que expressam CCR5 e/ou CX3CR1 na condição não-estimulada em mulheres que tiveram filhos assintomáticos. Neste mesmo grupo de mães, foram selecionadas células T CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$  (C) e as CD8+CD107a+ (D) após estimulação com *megapools* de ZIKV (n=4, [8 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]) e as células T analisadas segundo coexpressão ou não de CCR5 e/ou CX3CR1. (E-G) Mesmo tipo de análise foi realizada em mulheres que tiveram filhos com SCZ (n=7 [14 pontos por conta do ZIKV<sup>low</sup> e ZIKV<sup>int</sup>]). As análises estatísticas foram realizadas com o teste Friedman.**

#### 4.8. Avaliação da pureza e cálculo do título do ZIKV propagado.

O vírus (ZIKV ES29116) proveniente de uma paciente infectada pelo ZIKV em 2015, no Espírito Santo foi propagado em monocamadas de células VERO. A massa viral foi submetida ao RT-PCR para ZIKV, bem como para os DENV, CHIKV e YFV. Essas avaliações foram realizadas no intuito de confirmar o vírus propagado e ausência de vírus no controle celular (mock). O ensaio de RT-PCR foi realizado em duplicata para cada vírus testado. A suspensão viral deu resultado negativo para todos os arbovírus, com exceção do ZIKV (CT médio de 15,8). O controle celular foi também testado e foi negativo para todos os vírus.

O ensaio de placa (*Plaque Assay*) foi a metodologia utilizada para titular a suspensão viral. Observamos aparecimento de algumas placas nos poços com as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Conforme esperado, nas duas primeiras diluições ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ), o número de partículas virais foi alto, mas por conta da total destruição da monocamada não foi possível contar. As médias das diluições foram:  **$10^{-3}$  77 placas**,  **$10^{-4}$  12 placas**,  $10^{-5}$  1 placa e  $10^{-6}$  apresentou média de 0,3 placas. Nas diluições  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  não houve aparecimento de placas. Para o cálculo do título foi escolhido a diluição  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  por apresentarem médias maiores que 10 placas.

As diluições escolhidas (médias  $\geq 10$  placas) foram  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Em seguida, foi calculado a média de placa obtido nas duas diluições selecionadas:

$$\frac{77 \times 10^3 + 12 \times 10^4}{2} = \frac{7,7 \times 10^4 + 12 \times 10^4}{2} = 9,85 \times 10^4$$

O cálculo final do PFU foi de  $9,85 \times 100\mu\text{l}$  (volume do vírus)  $\times 10^4$  (diluição) =  $9,85 \times 10^5$  PFU/mL.

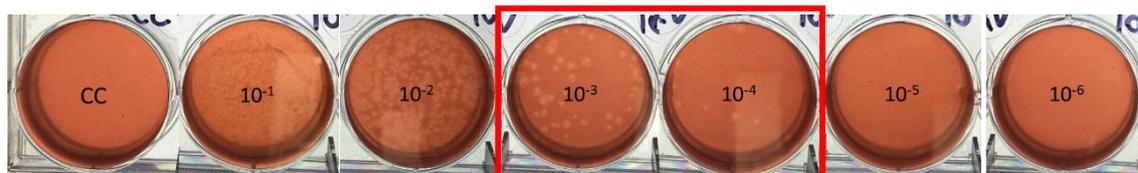


Figura 14: Titulação da massa viral de ZIKV por *Plaque Assay*. A contagem das placas foi realizada no 4º após a infecção.

#### **4.9. Avaliação da influência de CCL5 e CX3CL1 na funcionalidade das células T específicas aos megapools de ZIKV e ao propagado viral.**

Nesta etapa, foi proposto avaliar o grau de influência dos receptores CCR5 e CX3CR1 sobre a funcionalidade das células T ao serem tratadas com bloqueadores desses receptores no contexto de uma reexposição *in vitro* ao isolado do ZIKV ou aos megapools de ZIKV.

Inicialmente, foi realizado um ensaio no qual testamos qual seria o melhor bloqueio, se o uso de recombinantes humanos das quimiocinas (rhCCL5 e rhCX3CL1) ou anticorpo anti-quimiocina (anti-CCL5 ou anti-CX3CL1). Nesta etapa também foi utilizado um controle isotípico anti-IgG. Como observado na **Figura 15 A**, o uso de rhCCL5 ou rhCX3CL1 nas culturas de PBMC de doadores expostos ao ZIKV, reduziu significativamente a expressão de CCR5 tanto nas células T CD4+ (em meio a expressão de CCR5 nas CD4 foi de 14,2% e na presença de rhCCL5 foi de 2,01) quanto nas T CD8+ (em meio a expressão de CCR5 nas CD8 foi de 23,3% e na presença de rhCCL5 foi de 1,64) desses doadores. Isso também foi observado com o tratamento com rhCX3CL1 (em meio a expressão de CX3CR1 nas CD4 foi de 5,2% e na presença de rhCX3CL1 foi de 0,23% e em meio a expressão de CX3CR1 nas CD8 foi de 48,9% e na presença de rhCX3CL1 foi de 9,6%). Provavelmente, o tratamento com os recombinantes humanos ocupa os sítios de ligação de seus receptores específicos, resultando em uma diminuição da expressão desses receptores (**Figura 15 A**).

Por outro lado e de forma surpreendente, o uso de anticorpos bloqueadores anti-CCL5 ou anti-CX3CL1 não modificou a expressão de seus receptores específicos, nem nas células T CD4+ (na presença de anti-CCL5 a expressão de CCR5 nas CD4+ foi de 12,2% e com anti-CX3CL1 foi de 8,8%) nem nas T CD8+ (na presença de anti-CCL5 a expressão de CCR5 nas CD8+ foi de 19,3% e com anti-CX3CL1 foi de 43,8%). Desta forma, para dar continuidade aos experimentos, decidimos utilizar apenas os recombinantes humanos para os ensaios posteriores (**Figura 15 A**).

Para avaliar se o bloqueio da expressão de CCR5 ou CX3CR1 humanos poderia interferir na expressão de CD107a e, portanto, na atividade citotóxica das células T

expostas ao ZIKV (MOI 0,1) ou ao mock, realizamos uma cultura por 20h, até o momento com um único doador imune ao ZIKV.

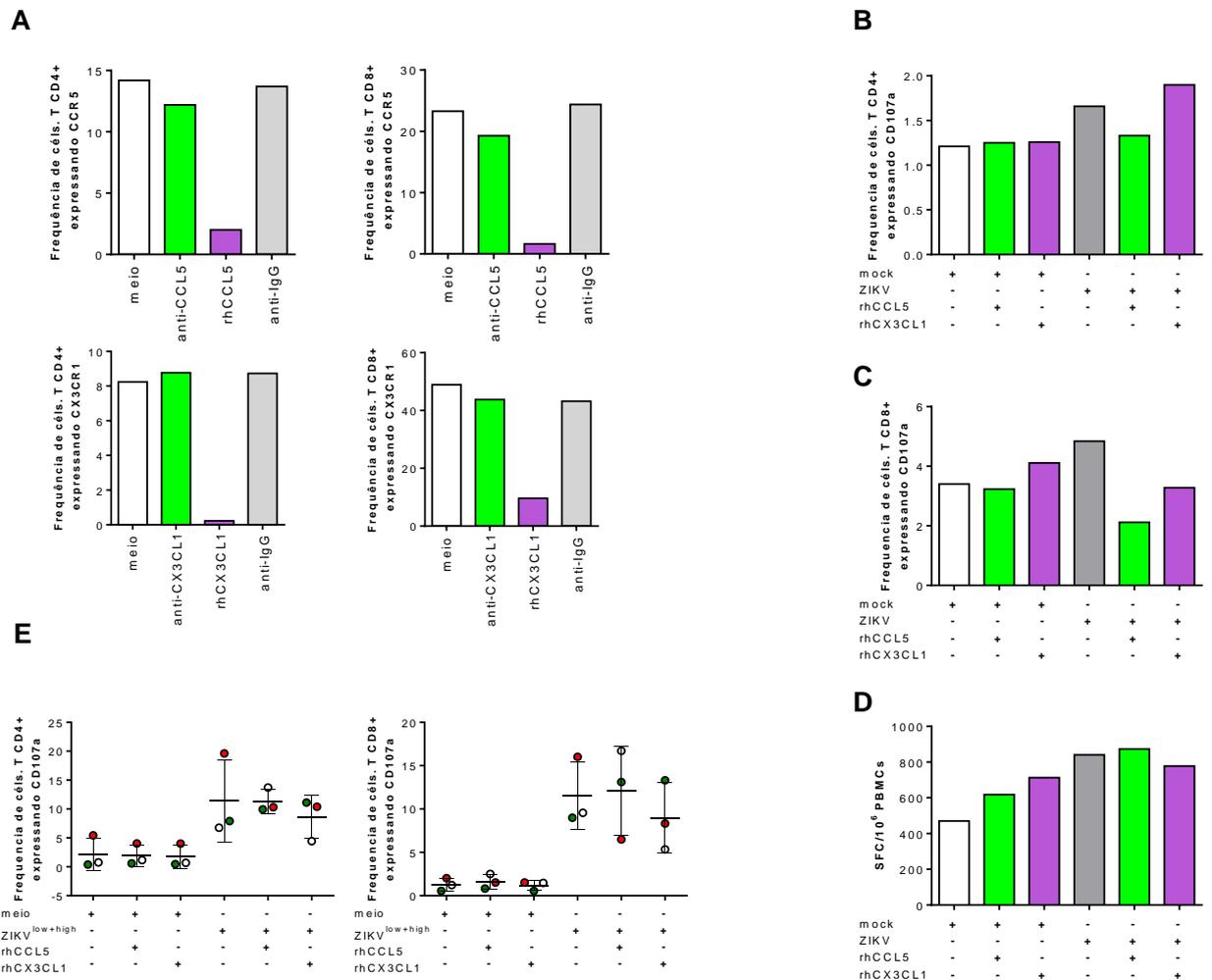
Como demonstrado na **Figura 15 B**, a exposição *in vitro* ao ZIKV não alterou a expressão de CD107a nas células T CD4+ quando comparadas as culturas com mock (mock CD4+CD107a+ foi de 1,2% e com ZIKV foi de 1,7%). Na condição de mock, o tratamento com os rhCCL5 ou rhCX3CL1 também não modificou a expressão de CD107a nas CD4+ (com rhCCL5 a expressão de CD4+CD107a+ foi de 1,3% e com rhCX3CL1 foi de 1,3%). Na condição de exposição ao ZIKV, o tratamento com os rhCCL5 ou rhCX3CL1 não modificou a expressão de CD107a nas CD4+ (com rhCCL5 a expressão de CD4+CD107a+ foi de 1,3% e com rhCX3CL1 foi de 1,9%).

De forma similar, como demonstrado na **Figura 15 C**, na condição de mock, o tratamento com os rhCCL5 ou rhCX3CL1 não modificou a expressão de CD107a nas CD8+ (com rhCCL5 a expressão de CD4+CD107a+ foi de 3,2% e com rhCX3CL1 foi de 4,1%). A exposição *in vitro* ao ZIKV não alterou de forma importante a expressão de CD107a nas células T CD8+ quando comparadas as culturas com mock (mock CD8+CD107a+ foi de 3,4% e com ZIKV foi de 4,8%). Por outro lado, na condição de exposição ao ZIKV, o tratamento com os rhCCL5 ou rhCX3CL1 modificou a expressão de CD107a nas CD8+ (com rhCCL5 a expressão de CD8+CD107a+ foi de 2,1% e com rhCX3CL1 foi de 3,3%). Esses dados precisam ser confirmados com um maior número de doadores, mas ao que parece, ***o bloqueio da expressão de CCR5 ou CX3CR1 humanos parece diminuir a expressão de CD107a e talvez a atividade citotóxica das células T CD8+ expostas ao ZIKV.***

Nesse mesmo modelo de ensaio foi avaliado a produção de IFN- $\gamma$  pelo EliSPOT (**Figura 15 D**). A exposição *in vitro* ao ZIKV aumentou o valor de produção de IFN- $\gamma$  pelo SFC/10<sup>6</sup> PBMC de 470 na cultura com mock para 840 na presença de ZIKV MOI 0,1. Parece que na condição de mock, o tratamento com os rhCCL5 ou rhCX3CL1 aumentou o valor de produção de IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> PBMC (com rhCCL5 618,5 e com rhCX3CL1 712,5). No entanto, na condição de exposição ao ZIKV, o tratamento com os rhCCL5 ou rhCX3CL1 não modificou de forma importante produção de IFN- $\gamma$  (com rhCCL5 873,3 e com rhCX3CL1 778). Assim, ***parece que o bloqueio da expressão de CCR5 ou CX3CR1 humanos não altera a produção de IFN- $\gamma$  nas células expostas ao ZIKV.***

Por fim, nós avaliamos o modelo *in vitro* acima substituindo o isolado de ZIKV pelos *megapools* de ZIKV<sup>low/int</sup> em uma cultura 6h em 3 diferentes doadores imunes ao ZIKV (**Figura 15 E**). A exposição aos *megapools* de ZIKV aumentou a expressão de CD107a nas células T CD4+ (em meio  $2,2 \pm 2,8$  e na presença dos *megapools* de ZIKV  $11,4 \pm 7,1$ ) e nas células T CD8+ (em meio  $1,3 \pm 0,7$  e na presença dos *megapools* de ZIKV  $12,1 \pm 5,2$ ) como observado nas mulheres expostas ao ZIKV durante a gravidez. Agora, de forma interessante, o tratamento com o rhCCL5 na presença dos *megapools* de ZIKV não alterou a expressão de CD107a nas CD4+ ( $11,3 \pm 2,1$ ) nem nas CD8+ ( $12,1 \pm 5,2$ ). No entanto, o tratamento com o rhCX3CL1 na presença dos *megapools* de ZIKV diminuiu expressão de CD107a nas CD4+ ( $8,7 \pm 3,7$ ) e nas CD8+ ( $9,0 \pm 4,0$ ). Assim, ***parece que o bloqueio da expressão de CX3CR1, mas não de CCR5, diminui a expressão de CD107a células T CD4+ e CD8+ quando expostas aos megapools de ZIKV.***

Esses resultados são ainda muito preliminares e deverão ser reavaliados na busca de um maior entendimento, por exemplo, dos mecanismos de modulação da expressão dos receptores de quimiocinas com o uso de anticorpos bloqueadores ou proteínas recombinantes e da modulação da função efetora das células.



**Figura 15: Influência de CCR5 e CX3CR1 sobre a funcionalidade das células T na reexposição *in vitro* ao isolado do ZIKV ou aos *megapools* de ZIKV.** Em (A), os dados demonstram expressão de CCR5 e de CX3CR1 nas células T CD4+ e CD8+ em ensaio no qual foram utilizados recombinantes humanos rhCCL5 e rhCX3CL1 ou anticorpos anti-CCL5 ou anti-CX3CL1. Análise da expressão de CD107a nas células T CD4+ (B) e CD8+ (C) por marcação extracelular por citometria de fluxo em culturas de 20h tratadas com rhCCL5 ou rhCX3CL1 seguida da exposição ao mock ou ao isolado de ZIKV. (D) Análise da produção de IFN- $\gamma$  por EliSPOT em culturas de 20h tratadas com rhCCL5 ou rhCX3CL1 seguida da exposição ao mock ou ao isolado de ZIKV. (A a D) n = 1 doador imune ao ZIKV. (E) Análise da expressão de CD107a nas células T CD4+ e CD8+ em culturas de 6h tratadas com rhCCL5 ou rhCX3CL1 seguida da exposição aos *megapools* de ZIKV. Análise de 3 doadores imunes ao ZIKV. Apenas nos dados da (E) foram aplicado o *Kruskal-Wallis test*, seguido do *Dunn's multiple comparisons test* que demonstraram resultados significativamente estatísticos ( $p < 0,05$ ).

## **5. Discussão**

Embora possamos encontrar numerosos estudos descrevendo a gravidez como um estado de “supressão imunológica” e, portanto, um período de maior susceptibilidade às doenças infecciosas, aspectos clínicos e evolutivos são contrários a esse conceito. A gravidez representa o período mais importante de conservação da espécie, portanto, é fundamental fortalecer todos os meios para proteger tanto a mãe, como a prole. Contrariando os mitos, o sistema imunológico materno durante a gravidez é caracterizado por uma rede reforçada de reconhecimento, comunicação, tráfego e reparo celulares; capaz de manter o bem-estar da mãe e do feto. Por outro lado, o feto, sem nenhuma dúvida, fornece um sistema imunológico ativo em desenvolvimento que modifica a maneira como a mãe responde ao meio ambiente, proporcionando uma “singularidade do sistema imunológico” durante gravidez. Assim sendo, é apropriado referir a gravidez como uma condição imunológica única, ativa, funcional e cuidadosamente modulada, mas não suprimida. A gravidez não deve implicar em uma maior susceptibilidade às doenças infecciosas, em vez disso, há uma modulação do sistema imunológico que leva a respostas diferenciais. Dependendo não apenas dos microrganismos, mas também do estágio da gravidez (Mor and Cardenas 2010).

A interface materno-fetal é formada por vários tipos de células imunes que contribuem para a proteção contra os microorganismos. A decídua basal, parte da placenta derivada do endométrio materno, contém macrófagos, células natural killer (NK) e células T regulatórias (Treg). Setenta por cento dos leucócitos deciduais são células NK, 20-25% são macrófagos e 1,7% são células dendríticas. As células B estão ausentes, mas as células T constituem cerca de 3-10% das células imunes deciduais. Durante o 1º trimestre, as células NK, células dendríticas e macrófagos se infiltram na decídua e se acumulam ao redor das células trofoblásticas (células periféricas do blastocisto, que ligam o zigoto à parede uterina e se tornam a placenta e as membranas que nutrem e protegem o organismo em desenvolvimento). Estudos mostraram que, na ausência de células NK uterinas, as células trofoblásticas não conseguem atingir a vascularização endometrial levando ao término da gravidez. Da mesma forma, a depleção das células dendríticas uterinas impede o implante de blastocisto e a formação da decídua. Consequentemente, a presença de células imunes no local da implantação não está associada a uma resposta ao feto "estranho",

mas à proteção da gravidez. Do lado fetal, nas vilosidades placentárias, há vasos sanguíneos fetais cercados por fibroblastos, macrófagos fetais (células Hofbauer), citotrofoblastos e o sinciciotrofoblasto multinucleado, uma cobertura epitelial que está em contato direto com o sangue materno (Racicot and Mor 2017).

Vírus ganham acesso às células dentro da decídua e da placenta subindo pelo trato reprodutivo inferior ou via transmissão hematogênica. Após o acesso ao trato reprodutivo superior, o tropismo viral para a decídua e/ou placenta é dependente da expressão do receptor de entrada viral nas células desses tecidos e da resposta imune materna específica ao vírus. Embora infecções virais sejam comuns durante a gravidez, a passagem transplacentária e a infecção fetal parecem ser uma exceção, ao invés de regra. As infecções virais durante a gravidez têm sido associadas a resultados adversos da gravidez e defeitos congênitos na prole; infelizmente, existem limitadas ferramentas terapêuticas ou preventivas para proteger a mãe e o feto durante as pandemias (Racicot and Mor 2017).

O recente surto de ZIKV no Brasil redirecionou a atenção sobre os riscos associados às infecções virais durante a gravidez. Membro da família Flaviviridae, ZIKV é transmitido pela picada de mosquito, mas é potencialmente transmitido por via sexual (Venturi, Zammarchi, et al. 2016). Além disso, durante o surto mais recente de ZIKV, quando as mães adquiriram o vírus durante a gravidez, ocorreu um aumento surpreendente na incidência de casos de anormalidades no cérebro e no sistema nervoso central de fetos (Oliveira et al. 2016; Mlakar et al. 2016; Rasmussen et al. 2016). Entre novembro de 2015 a outubro de 2019, o Ministério da Saúde foi notificado sobre 18.282 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento, dos quais 3.474 (19,0%) foram confirmados e relacionados à infecção pelo ZIKV. Entre os casos confirmados, 2.969 (85,5%) eram recém-nascidos ou crianças vivas e 505 (14,5%) eram fetos ou óbitos fetais, neonatais e infantis. Considerando apenas os casos confirmados, a grande maioria (78,3%) foi representada por recém-nascidos com microcefalia, seguida por crianças com microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (14,9%), em fetos (2,8%), em natimortos (2%) e em abortos espontâneos (1,9%). A maioria dos casos notificados concentrou-se na região Nordeste (56,9%) do país, seguido das regiões Sudeste (26,1%) e Centro-Oeste (7,7%). Os cinco estados com maior número de casos notificados foram Pernambuco

(16,2%), Bahia (14,9%), São Paulo (10,3%), Rio de Janeiro (6,6%) e Paraíba (6,6%) (Ministério da Saúde 2019).

Na tentativa de entender como foi o *priming* da resposta imune ao ZIKV durante a infecção no período gestacional, avaliamos os perfis inflamatório e citotóxico dos linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória específicos ao ZIKV de mulheres que foram infectadas pelo ZIKV na gestação, associando a funcionalidade das células T à expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CX3CR1. A resposta dos linfócitos T de memória frente aos *megapools* de ZIKV foi avaliada em 22 mulheres, dois a três anos após a fase aguda da infecção por ZIKV, reagrupadas de acordo com o desfecho clínico de seus filhos nascidos vivos em: assintomáticos e sintomáticos (alterações neurológicas caracterizadas pela SCZ).

Em nossa coorte, observamos que 64% das mulheres foram infectadas pelo ZIKV no 2º trimestre da gravidez, período no qual 75% delas tiveram filhos assintomáticos e 50% filhos com SCZ. Nossos dados foram corroborados por Brasil e colaboradores que acompanharam uma coorte de 345 mulheres grávidas, recrutadas entre setembro de 2015 e maio de 2016 no Rio de Janeiro. Nesta coorte, os autores descreveram as manifestações clínicas da infecção na mãe durante a gestação e as repercussões da infecção em seus filhos. Segundo os autores, a infecção pelo ZIKV ocorreu na 6º até a 39º semana de gestação, na qual 55% das mães que tiveram crianças acometidas com alguma alteração neurológica foram infectadas no 1º trimestre de gestação, 52% no 2º trimestre e 29% no 3º trimestre (Brasil et al. 2016). Assim, mesmo com um n amostral muito pequeno, nossos dados corroboram os dados de Brasil e colaboradores indicando que o período gestacional pode não estar diretamente relacionado como a causa principal para o desenvolvimento das anormalidades neurológicas em algumas das crianças.

Entretanto, o período gestacional parece influenciar no grau de acometimento neurológico das crianças expostas ao ZIKV intraútero. Estudo de caráter observacional-longitudinal avaliou o progresso clínico de crianças, desde o nascimento até 18 meses de vida (2016 a 2018), nascidas de mães que desenvolveram erupção cutânea durante a gravidez ou até 3 meses antes da gestação. Em 69% dos casos de SCZ, a mãe apresentou erupção cutânea no 1º trimestre de gestação, mostrando uma associação entre o período gestacional da

infecção materna com um pior prognóstico clínico, caracterizado por acometimento neurológico grave e artrogripose nas crianças (Vianna et al. 2019).

Outra questão importante levantada pelos cientistas e que independe do momento da infecção pelo ZIKV na gravidez é entender como pares de gêmeos dizigóticos podem ser discordantes em relação ao acometimento neurológico, uma vez que ambos foram expostos ao ZIKV no mesmo período gestacional. Neste contexto, Caires-Júnior e colaboradores analisaram células progenitoras neurais geradas a partir de amostras de sangue de 3 pares de crianças dizigóticas discordantes em relação ao desenvolvimento da SCZ. As células progenitoras neuronais provenientes dos gêmeos foram isoladas e infectadas *in vitro* com uma cepa brasileira de ZIKV. Os autores observaram que as células progenitoras neurais de crianças nascidas com SCZ são mais permissivas à infecção quando comparada às células das crianças assintomáticas. Ainda foi possível observar um perfil diferencial de expressão gênica das células progenitoras neurais das crianças com SCZ comparando-as às assintomáticas. Desta forma, os autores defendem que a SCZ não é um evento estocástico, depende da suscetibilidade intrínseca das células progenitoras neurais, possivelmente relacionada à mecanismos oligogênicos e/ou epigenéticos (Caires-Júnior et al. 2018).

Todas as mulheres incluídas neste estudo tiveram diagnóstico clínico e laboratorial (RT-PCR+) confirmado como infecção causada pelo ZIKV. Ao avaliar a exposição prévia ao DENV, como já esperado, observamos que 63,6% das mulheres estudadas apresentaram IgG anti-DENV e 81,2% apresentaram IgG anti-ZIKV. A maioria dos ELISA de IgG para diagnósticos disponíveis no mercado, foram ajustados para medir a exposição prévia aos arbovírus e, em geral, tendem a ter alta sensibilidade, mas sofrem de baixa especificidade devido à alta reatividade cruzada entre os arbovírus (flavivírus ou alfavírus) que circulam em uma determinada área geográfica ou com a vacinação recomendada contra o YFV (Charrel 2016; Haug, et al 2016). Desta forma, os falsos positivos podem levar a um viés de informação, mas que podem ser corrigidos com os ensaios de neutralização. Somente os ensaios de neutralização medem os parâmetros biológicos da neutralização de vírus *in vitro* e são os testes sorológicos mais específicos para vírus (Venturi, G et al. 2016). Esses testes, no entanto, consomem muito tempo, exigem muito trabalho e são caros e não são tão passíveis de testar muitos soros quanto o ELISA. Quando não é possível realizar os

testes de neutralização para complementar os resultados do IgG ELISA, devem ser considerados ao interpretar os resultados de soro prevalência, o contexto específico de cada país, incluindo a presença de outros flavivírus ou alfavírus em circulação e programas de imunização para YFV (Fritzell et al. 2018).

Estudo recente de Montoya e colaboradores avaliaram os anticorpos neutralizantes para o ZIKV e para os 4 sorotipos de DENV no soro de pessoas residentes da América Latina e Ásia. Foi um estudo longitudinal de pacientes acompanhados após a infecção pelo DENV durante 3 anos e de pacientes após a infecção pelo ZIKV por até 6 meses. Os resultados mostraram que nos pacientes expostos ao ZIKV, os títulos de anticorpos neutralizantes foram muito altos, com baixa reatividade cruzada aos DENV1-4. A neutralização cruzada foi maior na fase de convalescença precoce, mas depois a neutralização do ZIKV diminuiu, permanecendo em níveis baixos ao longo do tempo. Assim, os autores concluíram que os títulos de anticorpos neutralizantes podem distinguir as infecções pelo ZIKV e pelo DENV, quando ambos são analisados simultaneamente (Montoya et al. 2018). Outro estudo recente e muito interessante examinou coortes de indivíduos que apresentaram altos títulos de anticorpos neutralizantes para o ZIKV no Brasil e no México. Os autores constataram que a reatividade sorológica ao domínio III da proteína E do DENV1, antes da exposição ao ZIKV, está associada ao aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes do ZIKV após sua exposição. Esses anticorpos recorrentes reagem de maneira cruzada com o DENV1, mas não com outros flavivírus, neutralizam o DENV1 e o ZIKV e protegem os camundongos contra o desafio do ZIKV. Assim, altas respostas neutralizantes ao ZIKV estão associadas à reatividade pré-existente ao DENV1 em humanos (Robbiani et al. 2017). Desta forma, embora não tenhamos avaliado a especificidade dos resultados dos nossos ELISAs, nem a atividade neutralizante dos anticorpos, é possível que um percentual de nossos achados se dê pela reatividade-cruzada entre DENV e ZIKV, e que funcionalmente esses anticorpos sejam neutralizantes.

Como nosso estudo foi focado na resposta celular, nós fomos avaliar a frequência das células T CD4+ e T CD8+, assim como a razão dessas subpopulações, que são dados utilizados como indicativo de agravamento de certas doenças, principalmente na fase aguda, como na infecção pelo HIV e progressão para AIDS. Aqui, neste estudo, não foi observado diferença significativa nas frequências de células T CD4+

entre os grupos. No entanto, foi observado uma maior frequência de células T CD8+ no grupo de mulheres que tiveram filhos nascidos com SCZ quando comparado às aquelas que tiveram filhos assintomáticos. Por consequência, uma menor razão CD4/CD8 no grupo de mães que tiveram bebês com SCZ comparada às que tiveram bebês assintomáticos. Estudo anterior de nossa equipe observou uma redução nas frequências absolutas tanto das CD4+ como das CD8+ nos pacientes infectados pelo DENV nas fases agudas e convalescente precoce. Em outro estudo do nosso grupo, utilizamos uma coorte de indivíduos coinfectados DENV e HIV, na fase aguda da infecção pelo DENV. Foi observado que pacientes coinfectados DENV/HIV apresentaram altos percentuais de células T CD8+ e, assim, uma menor razão CD4/CD8 quando comparado aos indivíduos saudáveis e indivíduos monoinfectados com DENV (Torrentes-Carvalho et al. 2016). Vale lembrar que no presente estudo, o aumento observado na frequência relativa de células T CD8+ no grupo de mães que tiveram filhos com SCZ, em comparação às mães com filhos assintomáticos, 2-3 anos após a infecção pelo ZIKV. Portanto, não foi possível determinar se há uma relação desses dados nas mães com o desfecho clínico das crianças.

Partimos agora para as análises funcionais das células T, realizando uma abordagem que visava avaliar a imunocompetência dos indivíduos de nossa coorte. Para isso, observamos o grau de estimulação, principalmente das células T, a mitógeno como a PHA pelo ensaio de EliSpot. Essas análises nos indicaram que todos, com exceção de 1 indivíduo, são imunocompetentes. Bosco e colaboradores fizeram uma avaliação similar, utilizando dois grupos de pacientes, aqueles com tuberculose ativa comprovadamente imunocomprometidos (ATB) e os com tuberculose latente (ILTB) para confirmar o grau de imunocomprometimento desses indivíduos pelo ensaio de EliSpot. De acordo com os autores, células de pacientes ATB imunocomprometidos respondem ao estímulo PHA com menor produção de IFN- $\gamma$  comparado aos pacientes ILTB, mostrando que esse ensaio pode ser utilizado para auxiliar na indicação de pacientes imunocomprometidos com ATB (Bosco et al. 2017).

Dada a imunocompetência dos indivíduos presentes nesse estudo e tendo conhecimento prévio de que esses epítomos do *megapool* de ZIKV são imunogênicos (Grifoni et al. 2017), fomos avaliar a resposta específica das células T de pacientes comprovadamente expostos ao ZIKV aos peptídeos de ZIKV (*megapools* ZIKV<sup>low/int</sup>) e a resposta-cruzada a esses peptídeos em indivíduos imunes ao DENV pelo ensaio de

EliSpot. Nossos resultados demonstraram que 40% dos indivíduos imunes ao DENV são respondedores aos peptídeos do ZIKV. Grifoni e colaboradores demonstraram que as células T CD8+ de um terço dos doadores imunes ao DENV reconheceram peptídeos derivados de ZIKV. Já as células T CD4+ tiveram um maior nível de reatividade cruzada, já que os peptídeos derivados do ZIKV foram reconhecidos pelas células T CD4 de 4 de 5 indivíduos imunes ao DENV. Além disso, as células T CD8+ de mais de 50% de doadores que foram vacinados com a vacina atenuada tetravalente de dengue reconheceram os peptídeos derivados do ZIKV (Grifoni et al. 2017). Desta forma, corroborando os dados de Grifoni e colaboradores, a análise das respostas das células T de doadores imunes ao DENV revelou reatividade cruzada substancial aos peptídeos derivados de ZIKV.

Um dado muito surpreendente obtido em nosso estudo foi que 44% das mães que tiveram filhos assintomáticos e apenas 7,1% de mães que tiveram filhos com SCZ apresentaram resposta específica aos peptídeos do ZIKV. Esse dado é muito intrigante, pois poderia indicar que o *priming* da resposta imune, principalmente das células T produtoras de IFN- $\gamma$  não foi suficientemente eficiente na maioria das mães que tiveram filhos com SCZ. Não existe na literatura dados que possamos confrontar, mas vamos continuar nossa discussão observando as subpopulações celulares pela ensaios de ICS.

Como visto em nossos resultados, foi possível observar uma maior tendência de resposta, tanto em relação à magnitude como à frequência de respondedores, das células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  estimuladas *in vitro* com os *megapools* de ZIKV em mulheres com filhos assintomáticos do que nas mães que tiveram filhos com SCZ. Em contraste, a magnitude da resposta e a frequência de respondedores aos *megapools* de ZIKV pelas células T CD4+CD107a+ foi menor nas mães com filhos assintomáticos comparado àquelas com filhos com SCZ.

Em relação as células T CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$  foi possível observar que em relação a magnitude da resposta, os *megapools* de ZIKV induzem resposta similar nas mulheres, independente do desfecho clínico de seus filhos, com uma frequência de respondedores muito baixa. Já a resposta das células T CD8+CD107a+ aos *megapools* de ZIKV, a magnitude da resposta e a frequência de respondedores foi

maior nas mães com filhos com SCZ do que nas mães com filhos assintomáticos, com alta frequência de respondedores.

Dados coletados em humanos, embora não tão abundantes quanto os estudos em animais, sugerem que a proteção mediada por células T CD8+ contra a dengue grave está ligada à produção de IFN- $\gamma$  e à alelos do antígeno leucocitário humano (HLA) que induzem respostas do tipo polifuncionais. Isso considerando que as respostas das células T CD4+ do tipo polifuncionais são correlacionadas com a dengue branda (Weiskopf et al. 2013; Hatch et al. 2011).

Em estudo anterior, autores demonstraram diferenças altamente significativas na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no grupo de pacientes infectados pelo DENV que desenvolveram a Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) quando comparados ao grupo de pacientes que desenvolveram a Febre do Dengue (FD). De grande interesse neste estudo foi a constatação de que na FHD, menos células T produzem CD107a, enquanto uma maioria produz apenas citocinas inflamatórias. Essa situação é revertida na FD, na qual a maioria das células T produz apenas CD107a e a minoria, citocina. A expressão de CD107a foi encontrada tanto nas células T CD4+ como nas CD8+, o que se encaixa nos relatos de citotoxicidade das células T CD4+ anti-DENV, indicando possivelmente que essa população tenha um importante papel citotóxico in vivo (Duangchinda et al. 2010). Nosso grupo estudou anteriormente uma coorte de pacientes infectados pelo DENV nas fases aguda e convalescente. Na fase aguda da doença, foi possível avaliar os pacientes que desenvolveram a dengue branda e àqueles com sinais de alarme/graves. Embora sem significância estatística, observamos uma maior frequência de células T CD4+ expressando CD107a nos pacientes com dengue branda comparados aos pacientes com sinais de alarme/graves (de-Oliveira-Pinto et al. 2012).

É difícil extrapolar os dados da literatura que se basearam na infecção aguda pelo DENV com os nossos dados obtidos a partir de amostras coletadas 2-3 após a fase aguda da doença causada pela infecção pelo ZIKV. De qualquer forma, acreditamos que a resposta observada no nosso estudo revela um *priming* da resposta aguda a infecção pelo ZIKV, portanto, passível de comparação. Clinicamente, as mulheres envolvidas em nossa coorte de estudo foram todas sintomáticas, apresentando um curso da doença bastante semelhante, diferenciando

apenas no desfecho clínico de seus filhos. Um dado intrigante e que merece maiores avaliações é que, diferente da dengue, em que um perfil mais citotóxico e menos inflamatório está relacionado a um bom prognóstico da doença, na zika parece que o *priming* de células T com um perfil semelhante (mais citotóxico e menos inflamatório) estaria relacionado ao acometimento neurológico dos bebês. Esses dados precisam ser investigados, inclusive utilizando outros epítomos do ZIKV para confirmá-los. Além disso, nosso estudo avaliou mulheres que foram infectadas durante a gestação, o que poderia modular todo o *priming* da resposta imune primária ao ZIKV.

Durante um processo inflamatório, as quimiocinas inflamatórias e seus respectivos receptores são induzidos e passam a ser expressos nas células-alvo para o controle da migração coordenada de células para o sítio de inflamação, além do deslocamento de células imunes de locais periféricos até os órgãos linfoides de drenagem, a fim de iniciar uma resposta imunológica (Griffith et al 2014). Além de avaliar os aspectos funcionais das células T, extrapolamos nossas análises observando a magnitude da ativação das células T pela análise da expressão *ex vivo* dos receptores CCR5 e CX3CR1, úteis para dissecar subconjuntos de células T com distintas capacidades migratória e efectoras. Nesse estudo, demonstramos que apenas o grupo de mulheres que tiveram crianças com SCZ apresentam um aumento da frequência de células T CD4+ e T CD8+ expressando CCR5+ após estimulação com os *megapools* de ZIKV. Já em relação ao CX3CR1, as células T CD4+ de ambos os grupos de mulheres estudadas, aumentaram a frequência de células expressando CX3CR1, mas as células T CD8+ não.

Em estudo mais recente do nosso grupo, demonstramos um aumento da frequência de células T CD4+ e T CD8+ expressando tanto CCR5 como CX3CR1 na fase aguda da infecção pelo ZIKV em adultos não-grávidos, em relação aos doadores saudáveis (Badolato-Corrêa et al. 2018). Esses dados vão parcialmente em acordo com os dados demonstrados no estudo atual, indicando que na infecção pelo ZIKV, há um *priming* de células T expressando CCR5 e CX3CR1, o que foi revelado 2-3 anos após a fase aguda da infecção após estimulação *in vitro* com os peptídeos de ZIKV.

Nós também demonstramos em estudo anterior que as frequências de células T expressando CCR5+ foram marcadamente mais altas em pacientes apresentado

dengue aguda com sinais de alarme/graves, em relação aos dengue brando, pacientes na fase de convalescência e aos controles saudáveis. Além disso, detectamos uma diminuição dos níveis plasmáticos de CCL5 em pacientes na fase aguda da dengue, mas, ao analisar tecidos hepáticos dos casos fatais, encontramos uma alta frequência de células CCL5+. A partir do conjunto desses achados, sugerimos na época que as células CCR5+ do sangue estariam aptas a migrar para os tecidos hepáticos, estabelecendo um intenso processo inflamatório tecidual fortemente envolvido com um pior desfecho clínico do paciente (de-Oliveira-Pinto et al. 2012). Extrapolando esses achados com nossos dados atuais, como o aumento da frequência de células T CCR5+ após estimulação *in vitro* com os *megapools* de ZIKV se deu principalmente no grupo de mães que tiveram filhos com SCZ, de forma bastante especulativa poderíamos pensar que nessas mães, as células T CCR5+ exerceriam uma maior capacidade migratória para o sistema nervoso central do feto e, portanto, poderiam promover uma maior inflamação e/ou maior citotoxicidade tecidual. Lembrando que toda essa discussão ainda é muito especulativa e precisa ser avaliada.

Estudo anterior bastante interessante de Weiskopf e colaboradores demonstraram em doadores expostos ao DENV, uma frequência aumentada de células T CD4+CX3CR1+ apresentando atividade citotóxica específica ao DENV. Essas células T CD4+ citotóxicas eram mais frequentes em doadores que carregam um alelo HLA-DR protetor, o que levaria a um maior controle da infecção viral *in vivo* (Weiskopf et al. 2015). À luz de nossos achados, independente do desfecho clínico de seus filhos, os dois grupos de mães apresentaram um aumento da frequência de células T CD4+CX3CR1+ após estímulo *in vitro* com os peptídeos de ZIKV, podendo indicar que na infecção aguda pelo ZIKV, ocorreu um *priming* das células T CD4+ com atividade citotóxica.

No entanto, não detectamos um aumento da frequência de células T CD8+CX3CR1+ nos dois grupos de mães, após estimulação com os *megapools* de ZIKV. Bottcher e colaboradores avaliaram pacientes infectados cronicamente pelos vírus da hepatite B ou C (HBV ou HCV), mas recuperados da infecção pelo citomegalovírus (CMV). Nestes pacientes, os autores demonstraram uma alta frequência de linfócitos T CD8+ CMV-específicos CX3CR1+granzima B+perforina+, mas baixa frequência de linfócitos T CD8+ HBV ou HCV-específicos

CX3CR1+granzima B+perforina+. Esses dados poderiam indicar a relevância dessa subpopulação de células T CD8+CX3CR1+ no controle de infecções virais (Böttcher et al. 2015). Também de forma bastante especulativa, será que na infecção aguda pelo ZIKV em mulheres grávidas, não ocorreu um *priming* das células T CD8+ com atividade citotóxica específica? Como esses dados foram semelhantes nos dois grupos de mães, não conseguimos encontrar um paralelo com o desfecho clínico da criança. De qualquer forma, continuando as análises em nossa coorte, pudemos observar que a atividade citotóxica das células T CD4+ e T CD8+ dependem bastante da coexpressão de CCR5 e CX3CR1.

Assim, na tentativa de associar a funcionalidade das células T com a aquisição da expressão dos receptores CCR5 e CX3CR1 em indivíduos expostos ao ZIKV, não grávidos, nós bloqueamos esses receptores com o uso de recombinantes humanos específicos, como descrito anteriormente.

Nossos dados ainda são bem preliminares, mas observamos que a atividade citotóxica, mas não a inflamatória, das células T CD4+ e T CD8+ foram influenciadas pelo bloqueio de ambos os receptores CCR5 e CX3CR1. Por outro lado, a forma de apresentação antigênica parece também influenciar na funcionalidade das células T, seguido do bloqueio dos receptores. Assim, quando as células foram estimuladas *in vitro* com o isolado de ZIKV seguido do bloqueio dos receptores CCR5 e CX3CR1, as células T CD8+ diminuíram a expressão de CD107a. Enquanto que, quando as células foram estimuladas *in vitro* com os *megapools* de ZIKV, seguido do bloqueio dos receptores CX3CR1, mas não de CCR5, as células T CD4+ e CD8+ diminuíram a expressão de CD107a. Esses dados serão futuramente reavaliados com um maior número de doadores imunes ao ZIKV, inclusive com as células das mães. Outras abordagens deverão ser utilizadas além da medida da frequência de células T expressando os receptores de quimiocinas, como a medida da intensidade média de fluorescência desses receptores na célula. Avaliações adicionais como, cinética de estimulação e de bloqueio e perfil inflamatório serão realizadas.

## 6. Conclusões

A partir de nossos achados, concluímos que em estudo realizado numa coorte de mulheres que foram infectadas pelo ZIKV na gravidez, a imunidade ao DENV ou o período gestacional no qual ocorreu a infecção pelo ZIKV não influenciaram no desfecho clínico dos bebês. Diferente da infecção aguda pelo DENV no qual um perfil mais citotóxico e menos inflamatório estaria relacionado a um bom prognóstico, na infecção pelo ZIKV parece que o *priming* de células T com um perfil semelhante estaria relacionado a um pior acometimento neurológico dos bebês. Em adição, o *priming* de células T CCR5+ principalmente nas mães com bebês com SCZ, poderia contribuir para um maior perfil migratório das células T para o tecido cerebral fetal, estabelecendo maior atividade citotóxica tecidual e conseqüentemente, um maior acometimento neurológico do bebê. O papel das células T CD4+ na infecção aguda e resolução da infecção pelo ZIKV parece ser bastante importante, mas o papel das células T CD8+ precisa ser melhor investigado.

Acreditamos que este estudo possa contribuir na avaliação da resposta cruzada das células T de indivíduos que apresentam imunidade prévia ao DENV sendo exposto ou não ao ZIKV. Assim como em outros estudos, nosso estudo indica que o período gestacional no qual a mulher foi infectada não influenciou no desfecho clínico do bebê, mas que o *priming* da resposta imune ao ZIKV, no qual células T mais inflamatórias e menos citotóxicas estariam envolvidas com um melhor desfecho clínico do bebê.

## 7. Referências Bibliográficas

- Badolato-Corrêa, Jessica, Juan Camilo Sánchez-Arcila, Thiara Manuele Alves de Souza, Luciana Santos Barbosa, Priscila Conrado Guerra Nunes, Monique da Rocha Queiroz Lima, Mariana Gandini, et al. 2018. "Human T Cell Responses to Dengue and Zika Virus Infection Compared to Dengue/Zika Coinfection." *Immunity Inflammation and Disease* 6 (2): 194–206. <https://doi.org/10.1002/iid3.203>.
- Besnard, M., S. Lastère, A. Teissier, V. M. Cao-Lormeau, and D. Musso. 2014. "Evidence of Perinatal Transmission of Zika Virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014." *Eurosurveillance* 19 (13): 8–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>.
- Bogoch, Isaac I., Oliver J. Brady, Moritz U.G. Kraemer, Matthew German, Marisa I. Creatore, Manisha A. Kulkarni, John S. Brownstein, et al. 2016. "Anticipating the International Spread of Zika Virus from Brazil." *The Lancet* 387 (10016): 335–36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00080-5).
- Bolling, Bethany G., Scott C. Weaver, Robert B. Tesh, and Nikos Vasilakis. 2015. "Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community." *Viruses* 7 (9): 4911–28. <https://doi.org/10.3390/v7092851>.
- Bosco, Munyemana Jean, Hongyan Hou, Lie Mao, Xiaohui Wu, Kreeti Devi Ramroop, Yanfang Lu, Liyan Mao, Yu Zhou, Ziyong Sun, and Feng Wang. 2017. "The Performance of the TBAg/PHA Ratio in the Diagnosis of Active TB Disease in Immunocompromised Patients." *International Journal of Infectious Diseases* 59: 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.025>.
- Botta, Susumu. 1944. "EXPERIMENTAL STUDIES ON DENGUE From August to October , 1944 an Epidemic of Dengue Occurred in the Osaka-Kobe District . The Total Number Cludes a Famous Stock Brokerage Street with Many Banks and Offices . The Living High . During the Epidemic a Skin Rea," 10–12.
- Böttcher, Jan P., Marc Beyer, Felix Meissner, Zeinab Abdullah, Jil Sander, Bastian Höchst, Sarah Eickhoff, et al. 2015. "Functional Classification of Memory CD8 + T Cells by CX 3 CR1 Expression." *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9306>.

- Brasil, P., J.P. Pereira, Jr., M.E. Moreira, R.M. Ribeiro Nogueira, L. Damasceno, M. Wakimoto, R.S. Rabello, et al. 2016. "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro." *The New England Journal of Medicine* 375 (24): 2321–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>.
- Brito, Cileide Mascarenhas Lopes, Graciete Oliveira Vieira, Maria da Conceição Oliveira Costa, and Nelson Fernandes de Oliveira. 2011. "Desenvolvimento Neuropsicomotor: O Teste de Denver Na Triagem Dos Atrasos Cognitivos e Neuromotores de Pré-Escolares." *Cadernos de Saude Publica* 27 (7): 1403–14. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2011000700015>.
- Caires-Júnior, Luiz Carlos, Ernesto Goulart, Uirá Souto Melo, Bruno Silva Henrique Araujo, Lucas Alvizi, Alessandra Soares-Schanoski, Danyllo Felipe De Oliveira, et al. 2018. "Discordant Congenital Zika Syndrome Twins Show Differential in Vitro Viral Susceptibility of Neural Progenitor Cells." *Nature Communications* 9 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02790-9>.
- Calvet, Guilherme A., Ana Maria B. Filippis, Marcos Cesar L. Mendonça, Patricia C. Sequeira, Andre M. Siqueira, Valdilea G. Veloso, Rita M. Nogueira, and Patrícia Brasil. 2016. "First Detection of Autochthonous Zika Virus Transmission in a HIV-Infected Patient in Rio de Janeiro, Brazil." *Journal of Clinical Virology* 74: 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.11.014>.
- Calvet, Guilherme, Renato S. Aguiar, Adriana S.O. Melo, Simone A. Sampaio, Ivano de Filippis, Allison Fabri, Eliane S.M. Araujo, et al. 2016. "Detection and Sequencing of Zika Virus from Amniotic Fluid of Fetuses with Microcephaly in Brazil: A Case Study." *The Lancet Infectious Diseases* 16 (6): 653–60. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5).
- Campos, Gubio S., Antonio C. Bandeira, and Silvia I. Sardi. 2015. "Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil." *Emerging Infectious Diseases* 21 (10): 1885–86. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>.
- Cao-Lormeau, V.-M, A. Blake, S. Mons, S. Lastere, C. Roche, J. Vanhomwegen, T. Dub, et al. 2016. "Guillain-Barré Syndrome Outbreak Caused by ZIKA Virus Infection in French Polynesia." *Lancet* 387 (10027): 1531–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6). Guillain-Barr.

- Cao-Lormeau, Van Mai, Claudine Roche, Anita Teissier, Emilie Robin, Anne-Laure Berry, Henri-Pierre Mallet, Amadou Alpha Sall, and Didier Musso. 2014. "Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013." *Emerging Infectious Diseases* 20 (11). <https://doi.org/10.3201/eid2011.141380>.
- Charrel, Remi N. 2016. "Diagnosis of Arboviral Infections - A Quagmire of Cross Reactions and Complexities." *Travel Medicine and Infectious Disease* 14 (1): 11–12. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.01.006>.
- Créange, A. 2016. "Guillain-Barré Syndrome: 100 Years On." *Revue Neurologique* 172 (12): 770–74. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.10.011>.
- Da Silva, Ivan Rocha Ferreira, Jennifer A. Frontera, Ana Maria Bispo De Filippis, and Osvaldo Jose Moreira Do Nascimento. 2017. "Neurologic Complications Associated with the Zika Virus in Brazilian Adults." *JAMA Neurology* 74 (10): 1190–98. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1703>.
- de-Oliveira-Pinto, Luzia Maria, Cíntia Ferreira Marinho, Tiago Fajardo Pova, Elzinandes Leal de Azeredo, Luiza Assed de Souza, Luiza Damian Ribeiro Barbosa, Ana Rita C. Motta-Castro, et al. 2012. "Regulation of Inflammatory Chemokine Receptors on Blood T Cells Associated to the Circulating versus Liver Chemokines in Dengue Fever." *PLoS ONE* 7 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038527>.
- Dejnirattisai, Wanwisa, Piyada Supasa, Wiyada Wongwiwat, Alexander Rouvinski, Giovanna Barba-Spaeth, Thaneeya Duangchinda, Anavaj Sakuntabhai, et al. 2016. "Dengue Virus Sero-Cross-Reactivity Drives Antibody-Dependent Enhancement of Infection with Zika Virus." *Nature Immunology* 17 (9): 1102–8. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>.
- Diamond, Michael S., Julie E. Ledgerwood, and Theodore C. Pierson. 2018. "Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges." *Annual Review of Medicine* 70 (1): 121–35. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040717-051127>.
- Dick, G. W.; Kitchen, S. F. and Haddow, A. J. 1952. "ZIKA VIRUS (I). ISOLATIONS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY BY." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 46 (5): 509–20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

- Domingo, Cristina, Pranav Patel, Jasmin Yillah, Manfred Weidmann, Jairo A. Méndez, Emmanuel Rivalyn Nakouné, and Matthias Niedrig. 2012. "Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories." *Journal of Clinical Microbiology* 50 (12): 4054–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12>.
- Dowd, Kimberly A., Christina R. DeMaso, Rebecca S. Pelc, Scott D. Speer, Alexander R.Y. Smith, Leslie Goo, Derek J. Platt, et al. 2016. "Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype." *Cell Reports* 16 (6): 1485–91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.049>.
- Duangchinda, Thaneeya, Wanwisa Dejnirattisai, Sirijit Vasanawathana, Wannee Limpitikul, Nattaya Tangthawornchaikul, Prida Malasit, Juthathip Mongkolsapaya, and Gavin Screaton. 2010. "Immunodominant T-Cell Responses to Dengue Virus NS3 Are Associated with DHF." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (39): 16922–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010867107>.
- Duffy, Mark R., Tai-Ho Chen, W. Thane Hancock, Ann M. Powers, Jacob L. Kool, Robert S. Lanciotti, Moses Pretrick, et al. 2009. "Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia." *New England Journal of Medicine*, 2536–43.
- Durrant, Douglas M., Brian P. Daniels, Tracy Jo Pasioka, Denise Dorsey, and Robyn S. Klein. 2015. "CCR5 Limits Cortical Viral Loads during West Nile Virus Infection of the Central Nervous System." *Journal of Neuroinflammation* 12 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0447-9>.
- Fauci, Anthony S., and David M. Morens. 2016. "Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat." *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*, 1–3.
- Faye, Oumar, Caio C.M. Freire, Atila Iamarino, Ousmane Faye, Juliana Velasco C. de Oliveira, Mawlouth Diallo, Paolo M.A. Zanotto, and Amadou Alpha Sall. 2014. "Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (1): 36. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>.
- Figueiredo, Luiz Tadeu Moraes. 2007. "Emergent Arboviruses in Brazil." *Revista Da*

*Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (2): 224–29.  
<https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000200016>.

Fritzell, Camille, Dominique Rousset, Antoine Adde, Mirdad Kazanji, Maria D. Van Kerkhove, and Claude Flamand. 2018. “Current Challenges and Implications for Dengue, Chikungunya and Zika Seroprevalence Studies Worldwide: A Scoping Review.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (7): 1–29.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006533>.

Gillespie, Leah K., Antje Hoenen, Gary Morgan, and Jason M. Mackenzie. 2010. “The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex.” *Journal of Virology* 84 (20): 10438–47.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.00986-10>.

González-Motos, Víctor, Kai A. Kropp, and Abel Viejo-Borbolla. 2016. “Chemokine Binding Proteins: An Immunomodulatory Strategy Going Viral.” *Cytokine and Growth Factor Reviews* 30: 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.02.007>.

Gourinat, Ann Claire, Olivia O’Connor, Elodie Calvez, Cyrille Goarant, and Myrielle Dupont-Rouzeyrol. 2015. “Detection of Zika Virus in Urine.” *Emerging Infectious Diseases* 21 (1): 84–86. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>.

Griffith, Jason W., Caroline L. Sokol, and Andrew D. Luster. 2014. “Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity.” *Annual Review of Immunology* 32 (1): 659–702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>.

Grifoni, Alba, John Pham, John Sidney, Patrick H. O’Rourke, Sinu Paul, Bjoern Peters, Sheridan R. Martini, et al. 2017. “Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans.” *Journal of Virology*, no. October: JVI.01469-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01469-17>.

Gubler, Duane J. 1998. “Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.” *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 11 (3): 480–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3935-5.00075-6>.

Gutsche, Irina, Fasséli Coulibaly, James E. Voss, Jérôme Salmon, Jacques D’Alayer, Myriam Ermonval, Eric Larquet, et al. 2011. “Secreted Dengue Virus Nonstructural

- Protein NS1 Is an Atypical Barrel-Shaped High-Density Lipoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (19): 8003–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>.
- Guzman, Maria G., Duane J. Gubler, Alienys Izquierdo, Eric Martinez, and Scott B. Halstead. 2016. "Dengue Infection." *Nature Reviews Disease Primers* 2: 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>.
- Guzman, Maria G., Scott B. Halstead, Harvey Artsob, Philippe Buchy, Jeremy Farrar, Duane J. Gubler, Elizabeth Hunsperger, et al. 2010. "Dengue: A Continuing Global Threat." *Nature Reviews Microbiology* 8 (12): S7–16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>.
- Guzman, Maria G., and Eva Harris. 2015. "Dengue." *The Lancet* 385 (9966): 453–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9).
- Guzman, Maria G., and Susana Vazquez. 2010. "The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection." *Viruses* 2 (12): 2649–62. <https://doi.org/10.3390/v2122649>.
- Halstead, Scott B., Henry Shotwell, and Jordi Casals. 1973. "Studies on the Pathogenesis of Dengue Infection in Monkeys. II. Clinical Laboratory Responses to Heterologous Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 128 (1): 15–22. [http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com\\_dbook&task=readonline&book\\_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component](http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component).
- Hamel, Rodolphe, Ophélie Dejarnac, Sineewanlaya Wichit, Peeraya Ekchariyawat, Aymeric Neyret, Natthanej Luplertlop, Manuel Perera-Lecoin, et al. 2015. "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells." *Journal of Virology* 89 (17): 8880–96. <https://doi.org/10.1128/jvi.00354-15>.
- Hatch, Steven, Tim P. Endy, Stephen Thomas, Anuja Mathew, James Potts, Pamela Pazoles, Daniel H. Libraty, Robert Gibbons, and Alan L. Rothman. 2011. "Intracellular Cytokine Production by Dengue Virus-Specific T Cells Correlates with Subclinical Secondary Infection." *Journal of Infectious Diseases* 203 (9): 1282–91. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir012>.

- Haug, Charlotte J., Marie Paule Kieny, and Bernadette Murgue. 2016. "The Zika Challenge." *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*, 1–3.
- Heinz, Franz X., and Karin Stiasny. 2017. "The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81 (1): 1–27. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00055-16>.
- Herrero, Lara J., Andrew Zakhary, Michelle E. Gahan, Michelle A. Nelson, Belinda L. Herring, Andrew J. Hapel, Paul A. Keller, et al. 2013. "Dengue Virus Therapeutic Intervention Strategies Based on Viral, Vector and Host Factors Involved in Disease Pathogenesis." *Pharmacology and Therapeutics* 137 (2): 266–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.007>.
- Hugo, Leon E., Liesel Stassen, Jessica La, Edward Gosden, O'mezie Ekwudu, Clay Winterford, Elvina Viennet, Helen M. Faddy, Gregor J. Devine, and Francesca D. Frentiu. 2019. "Vector Competence of Australian *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* for an Epidemic Strain of Zika Virus." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (4): e0007281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007281>.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019, Disponível em <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>> Acessado em 2 de novembro de 2019
- Johnson, Barbara W, Brandy J Russell, Robert S Lanciotti, and J C L I N M Icrobiol. 2005. "Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay." *New York* 43 (10): 4977–83. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4977>.
- Kaufmann, Bärbel, and Michael G. Rossmann. 2011. "Molecular Mechanisms Involved in the Early Steps of Flavivirus Cell Entry." *Microbes and Infection* 13 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.005>.
- Kiefer, Friedemann, and Arndt F. Siekmann. 2011. "The Role of Chemokines and Their Receptors in Angiogenesis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (17): 2811–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0677-7>.
- Klema, Valerie J., Radhakrishnan Padmanabhan, and Kyung H. Choi. 2015. "Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA

- Capping.” *Viruses* 7 (8): 4640–56. <https://doi.org/10.3390/v7082837>.
- Kufareva, Irina. 2016. “Chemokines and Their Receptors: Insights from Molecular Modeling and Crystallography.” *Current Opinion in Pharmacology* 30: 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.006>.
- Kuno, G., and G. J J Chang. 2007. “Full-Length Sequencing and Genomic Characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika Viruses.” *Archives of Virology* 152 (4): 687–96. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>.
- Lanciotti, Robert S., Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Amanda J. Panella, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, and Grant L. Campbell. 2007. “Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006.” *Emerging Infectious Diseases* 13 (5): 764–67. <https://doi.org/10.3201/eid1305.070015>.
- Lanciotti, Robert S., Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, Alison J. Johnson, Stephanie M. Stanfield, and Mark R. Duffy. 2008. “Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.” *Emerging Infectious Diseases* 14 (8): 1232–39. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>.
- Lazear, HM, and MS Diamond. 2016. “Zika Virus : New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere.” *Journal of Virology* 90 (10): 4864–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-16.Editor>.
- Lescar, Julien, Sherryl Soh, Le Tian Lee, Subhash G Vasudevan, and Congbao Kang. 2018. “The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity.” *Springer Nature Singapore* 1062. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1>.
- Lim, Mei Qiu, Emmanuelle A.P. Kumaran, Hwee Cheng Tan, David C. Lye, Yee Sin Leo, Eng Eong Ooi, Paul A. MacAry, Antonio Bertoletti, and Laura Rivino. 2018. “Cross-Reactivity and Anti-Viral Function of Dengue Capsid and NS3- Specific Memory t Cells toward Zika Virus.” *Frontiers in Immunology* 9 (OCT): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02225>.
- López-Cotarelo, Pilar, Carolina Gómez-Moreira, Olga Criado-García, Lucas Sánchez, and José Luis Rodríguez-Fernández. 2017. “Beyond Chemoattraction:

- Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes.” *Trends in Immunology* 38 (12): 927–41. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.004>.
- MacNamara, F. N. 1954. “Zika Virus: A Report on Three Cases of Human Infection during an Epidemic of Jaundice in Nigeria.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 48 (2): 139–45. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1).
- Malavige, Gathsaurie Neelika, and Graham S. Ogg. 2013. “T Cell Responses in Dengue Viral Infections.” *Journal of Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.023>.
- Marques, Rafael E., Rodrigo Guabiraba, Juliana L. Del Sarto, Rebeca F. Rocha, Ana Luiza Queiroz, Daniel Cisalpino, Pedro E. Marques, et al. 2015. “Dengue Virus Requires the CC-Chemokine Receptor CCR5 for Replication and Infection Development.” *Immunology* 145 (4): 583–96. <https://doi.org/10.1111/imm.12476>.
- Masopust, David, and Jason M. Schenkel. 2013. “The Integration of T Cell Migration, Differentiation and Function.” *Nature Reviews Immunology* 13 (5): 309–20. <https://doi.org/10.1038/nri3442>.
- Matsushima, Kouji, Yuya Terashima, Etsuko Toda, Francis Shand, and Satoshi Ueha. 2011. “Chemokines in Inflammatory and Immune Diseases.” *Inflammation and Regeneration* 31 (1): 11–22. <https://doi.org/10.2492/inflammregen.31.11>.
- Mesci, Pinar, Angela Macia, Christopher N. LaRock, Leon Tejwani, Isabella R. Fernandes, Nicole A. Suarez, Paolo M.de A. Zanutto, Patricia C.B. Beltrão-Braga, Victor Nizet, and Alysson R. Muotri. 2018. “Modeling Neuro-Immune Interactions during Zika Virus Infection.” *Human Molecular Genetics* 27 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx382>.
- Ministério da Saúde. 2017. “Boletim Epidemiológico - Monitoramento Dos Casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre Pelo Vírus Zika Até a Semana Epidemiológica 52, 2016” 48: 1–11. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>.

- Ministério da Saúde. 2018. “Boletim Epidemiológico - Monitoramento Dos Casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre Pelo Virus Zika Até a Semana Epidemiológica 52, 2017” 49: 1–13.
- Ministério da Saúde. 2019. “Boletim Epidemiológico - Monitoramento Dos Casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Doença Aguda Pelo Vírus Zika Até a Semana Epidemiológica 52 de 2018” 50 (4): 1–14.  
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>.
- Ministério da Saúde. 2019. “Boletim Epidemiológico - Síndrome Congênita Pelo Vírus Zika Associada à Infecção - Situação Epidemiológica, Ações Desenvolvidas e Desafios de 2015 a 2019.”
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015. “Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia Relacionada à Infecção Pelo Vírus Zika.”  
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigil--ncia-e-resposta---vers--o-1----09dez2015-8h.pdf>.
- Ministério da Saúde. 2017. *Orientações Integradas de Vigilância e Atenção à Saúde No Âmbito Da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional. Ministério Da Saúde.*  
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/12/orientacoes-integradas-vigilancia-atencao.pdf>.
- Ministério da Saúde. 2019. “Monitoramento Dos Casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas Pelo Aedes Aegypti: Dengue, Chikungunya – Semanas Epidemiológicas 1 a 40 e Zika – Semanas Epidemiológicas 1 a 37” 50.  
<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/13/BE-sarampo-23-final.pdf>.
- Mlakar, Jernej, Misa Korva, Nataša Tul, Mara Popović, Mateja Poljšak-Prijatelj, Jerica Mraz, Marko Kolenc, et al. 2016. “Zika Virus Associated with Microcephaly.” *New England Journal of Medicine* 374 (10): 951–58.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>.
- Mongkolsapaya, Juthathip, Wanwisa Dejnirattisai, Xiao Ning Xu, Sirijitt Vasanawathana, Nattaya Tangthawornchaikul, Aroonrung Chairunsri, Siraporn

- Sawasdivorn, et al. 2003. "Original Antigenic Sin and Apoptosis in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever." *Nature Medicine* 9 (7): 921–27. <https://doi.org/10.1038/nm887>.
- Montoya, Magelda, Matthew Collins, Wanwisa Dejnirattisai, Leah C. Katzelnick, Henry Puerta-Guardo, Ramesh Jadi, Samuel Schildhauer, et al. 2018. "Longitudinal Analysis of Antibody Cross-Neutralization Following Zika Virus and Dengue Virus Infection in Asia and the Americas." *Journal of Infectious Diseases* 218 (4): 536–45. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy164>.
- Mor, Gil, and Ingrid Cardenas. 2010. "The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity." *Am J Reprod Immunol* 63 (6): 425–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>.The.
- Moser, Bernhard, Marlene Wolf, Alfred Walz, and Pius Loetscher. 2004. "Chemokines: Multiple Levels of Leukocyte Migration Control." *Trends in Immunology* 25 (2): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.005>.
- Musso, Didier, and Duane J. Gubler. 2016. "Zika Virus." *Clinical Microbiology Reviews* 29. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>.Address.
- Musso, Didier, Claudine Roche, Tu Xuan Nhan, Emilie Robin, Anita Teissier, and Van Mai Cao-Lormeau. 2015. "Detection of Zika Virus in Saliva." *Journal of Clinical Virology* 68: 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>.
- Nanki, Toshihiro, Toshio Imai, and Shinichi Kawai. 2017. "Fractalkine/CX3CL1 in Rheumatoid Arthritis." *Modern Rheumatology* 27 (3): 392–97. <https://doi.org/10.1080/14397595.2016.1213481>.
- Ngono, Annie Elong, and Sujan Shresta. 2018. "Immune Response to Dengue and Zika."
- Oliveira Melo, A. S., G. Malinger, R. Ximenes, P. O. Szejnfeld, S. Alves Sampaio, and A. M. Bispo De Filippis. 2016. "Zika Virus Intrauterine Infection Causes Fetal Brain Abnormality and Microcephaly: Tip of the Iceberg?" *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 47 (1): 6–7. <https://doi.org/10.1002/uog.15831>.
- Oliveira, Wanderson Kleber de, Juan Cortez-Escalante, Wanessa Tenório Gonçalves Holanda De Oliveira, Greice Madeleine Ikeda do Carmo, Cláudio Maierovitch

- Pessanha Henriques, Giovanini Evelim Coelho, and Giovanny Vinícius Araújo de França. 2016. "Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65: 242–47. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.05.007>.
- Pagani, Francesca, Rosa C. Paolicelli, Emanuele Murana, Barbara Cortese, Silvia Di Angelantonio, Emanuele Zurolo, Eva Guiducci, et al. 2015. "Defective Microglial Development in the Hippocampus of Cx3cr1 Deficient Mice." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (March): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00111>.
- Pardy, Ryan D., and Martin J. Richer. 2019. "Protective to a T: The Role of T Cells during Zika Virus Infection." *Cells* 8 (8): 820. <https://doi.org/10.3390/cells8080820>.
- Paz-Bailey, Gabriela, Eli S. Rosenberg, Kate Doyle, Jorge Munoz-Jordan, Gilberto A. Santiago, Liore Klein, Janice Perez-Padilla, et al. 2018. "Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Preliminary Report." *New England Journal of Medicine* 379 (13): 1234–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613108>.
- Pierson, Theodore C., and Michael S. Diamond. 2012. "Degrees of Maturity: The Complex Structure and Biology of Flaviviruses." *Current Opinion in Virology* 2 (2): 168–75. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.011>.
- Racicot, Karen, and Gil Mor. 2017. "Risks Associated with Viral Infections during Pregnancy." *J Clin Invest* 127 (5): 1591–99. <https://doi.org/10.1172/JCI87490>.
- Rasmussen, Sonja A., Denise J. Jamieson, Margaret A. Honein, and Lyle R. Petersen. 2016. "Zika Virus and Birth Defects - Reviewing the Evidence for Causality." *New England Journal of Medicine* 374 (20): 1981–87. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1604338>.
- Reddy, Sindhoora Bhargavi Gopala, Wei-Xin Chin, and Nanjunda Swamy Shivananju. 2018. "Dengue Virus NS2 and NS4: Minor Proteins, Mammoth Roles." *Biochemical Pharmacology* 154 (April): 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008>.
- Ridiandries, Anisyah, Joanne T.M. Tan, and Christina A. Bursill. 2016. "The Role of CC-Chemokines in the Regulation of Angiogenesis." *International Journal of*

*Molecular Sciences* 17 (11): 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms17111856>.

Robbiani, Davide F., Leonia Bozzacco, Jennifer R. Keeffe, Ricardo Khouri, Priscilla C. Olsen, Anna Gazumyan, Dennis Schaefer-Babajew, et al. 2017. “Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico.” *Cell* 169 (4): 597-609.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.024>.

Russell, Kate, Susan L. Hills, Alexandra M. Oster, Charsey Cole Porse, Gregory Danyluk, Marshall Cone, Richard Brooks, et al. 2017. “Male-to-Female Sexual Transmission of Zika Virus-United States, January-April 2016.” *Clinical Infectious Diseases* 64 (2): 211–13. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw692>.

Saa, Paula, Charles Chiu, Kacie Grimm, Guixia Yu, Richard J. Benjamin, Laurence Corash, and Susan L. Stramer. 2019. “Acute Zika Virus Infection in an Asymptomatic Blood Donor at the Onset of the Puerto Rico Epidemic.” *Transfusion*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/trf.15484>.

Sager, Garrett, Samuel Gabaglio, Elizabeth Sztul, and George A. Belov. 2018. “Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle.” *Viruses* 10 (10): 2013–14. <https://doi.org/10.3390/v10100559>.

Sakkas, Hercules, Vangelis Economou, and Chrissanthy Papadopoulou. 2016. “Zika Virus Infection: Past and Present of Another Emerging Vector-Borne Disease.” *Journal of Vector Borne Diseases* 53 (4): 305–11.

Santoni, Matteo, Sergio Bracarda, Massimo Nabissi, Francesco Massari, Alessandro Conti, Emilio Bria, Giampaolo Tortora, Giorgio Santoni, and Stefano Cascinu. 2014. “CXC and CC Chemokines as Angiogenic Modulators in Nonhaematological Tumors.” *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/768758>.

Schuler-Faccini, Lavinia, Erlane M. Ribeiro, Ian M.L. Feitosa, Dafne D.G. Horovitz, Denise P. Cavalcanti, André Pessoa, Maria Juliana R. Dorigui, et al. 2016. “Possible Association between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015.” *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65 (3): 59–62. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>.

Song, Byung Hak, Sang Im Yun, Michael Woolley, and Young Min Lee. 2017. “Zika

- Virus: History, Epidemiology, Transmission, and Clinical Presentation.” *Journal of Neuroimmunology* 308: 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>.
- Terzian, Ana Carolina Bernardes, Alessandra Soares Schanoski, Mânlio Tasso De Oliveira Mota, Rafael Alves Da Silva, Cássia Fernanda Estofolete, Tatiana Elias Colombo, Paula Rahal, et al. 2017. “Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-Infected Patients.” *Clinical Infectious Diseases* 65 (8): 1260–65. <https://doi.org/10.1093/cid/cix558>.
- Tisoncik, J. R., M. J. Korth, C. P. Simmons, J. Farrar, T. R. Martin, and M. G. Katze. 2012. “Into the Eye of the Cytokine Storm.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1): 16–32. <https://doi.org/10.1128/mnbr.05015-11>.
- Torrentes-Carvalho, Amanda, Eugênio Damaceno Hottz, Cintia Ferreira Marinho, Jéssica Badolato Corrêa da Silva, Luzia Maria de Oliveira Pinto, Luciana Gomes Fialho, Fernando Augusto Bozza, et al. 2016. “Characterization of Clinical and Immunological Features in Patients Coinfected with Dengue Virus and HIV.” *Clinical Immunology* 164: 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.01.005>.
- Venturi, G., L. Zammarchi, C. Fortuna, M. E. Remoli, E. Benedetti, C. Fiorentini, M. Trotta, et al. 2016. “An Autochthonous Case of Zika Due to Possible Sexual Transmission, Florence, Italy, 2014.” *Eurosurveillance* 21 (8): 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30148>.
- Venturi, G, L Zammarchi C Fortuna, ME Remoli, E Benedetti, C Fiorentini, M Trotta, C Rizzo, A Mantella, G Rezza, and A Bartoloni. 2016. “Authors’ Reply: Diagnostic Challenges to Be Considered Regarding Zika Virus in the Context of the Presence of the Vector *Aedes Albopictus* in Europe.” *Euro Surveill* 21: 1–2. <https://doi.org/10.3201/eid2102.140291>.
- Vianna, Renata Artimos de Oliveira, Kathryn Lynn Lovero, Solange Artimos de Oliveira, Alexandre Ribeiro Fernandes, Teresa Cristina Sarmet dos Santos, Luiz Cláudio Santos de Souza Lima, Fabiana Rabe Carvalho, et al. 2019. “Children Born to Mothers with Rash During Zika Virus Epidemic in Brazil: First 18 Months of Life.” *Journal of Tropical Pediatrics*, no. Group 1: 1–11. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmz019>.

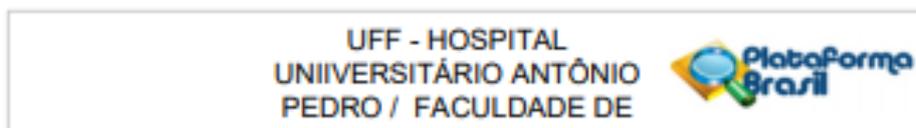
- Weiskopf, D., M. A. Angelo, E. L. de Azeredo, J. Sidney, J. A. Greenbaum, A. N. Fernando, A. Broadwater, et al. 2013. “Comprehensive Analysis of Dengue Virus-Specific Responses Supports an HLA-Linked Protective Role for CD8+ T Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (22): E2046–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305227110>.
- Weiskopf, Daniela, Michael A. Angelo, Alba Grifoni, Patrick H. O’Rourke, John Sidney, Sinu Paul, Aruna D. De Silva, et al. 2016. “HLA-DRB1 Alleles Are Associated with Different Magnitudes of Dengue Virus-Specific CD4+T-Cell Responses.” *Journal of Infectious Diseases* 214 (7): 1117–24. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw309>.
- Weiskopf, Daniela, Derek J. Bangs, John Sidney, Ravi V. Kolla, Aruna D. De Silva, Aravinda M. de Silva, Shane Crotty, Bjoern Peters, and Alessandro Sette. 2015. “Dengue Virus Infection Elicits Highly Polarized CX3CR1 + Cytotoxic CD4 + T Cells Associated with Protective Immunity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (31): E4256–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505956112>.
- Wu, Ren-Huang, Ming-Han Tsai, Kuen-Nan Tsai, Jia Ni Tian, Jian-Sung Wu, Su-Ying Wu, Jyh-Haur Chern, Chun-Hong Chen, and Andrew Yueh. 2017. “Mutagenesis of Dengue Virus Protein NS2A Revealed a Novel Domain Responsible for Virus-Induced Cytopathic Effect and Interactions between NS2A and NS2B Transmembrane Segments.” *Journal of Virology* 91 (12): 1–24. <https://doi.org/10.1128/jvi.01836-16>.
- Zanluca, Camila, Vanessa Campos Andrade de Melo, Ana Luiza Pamplona Mosimann, Glauco Igor Viana dos Santos, Claudia Nunes Duarte dos Santos, and Kleber Luz. 2015. “First Report of Autochthonous Transmission of Zika Virus in Brazil.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (4): 569–72. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>.
- Zhang, Nana, Nana Zhang, Cheng Feng Qin, Xinyi Liu, Lei Shi, and Zhiheng Xu. 2016. “Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice.” *Cell Stem Cell* 19 (1): 120–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>.
- Zhao, Baoyu, Guanghui Yi, Fenglei Du, Yin Chih Chuang, Robert C. Vaughan, Banumathi Sankaran, C. Cheng Kao, and Pingwei Li. 2017. “Structure and

Function of the Zika Virus Full-Length NS5 Protein.” *Nature Communications* 8: 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms14762>.

Zlotnik, Albert, and Osamu Yoshie. 2012. “The Chemokine Superfamily Revisited.” *Immunity* 36 (5): 705–16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008>.

## Anexos

### 7.1. Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Rastreamento molecular do vírus ZIKA em gestantes com exantema no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense

**Pesquisador:** CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 62995516.8.0000.5243

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.922.855

##### Apresentação do Projeto:

Este projeto tem seu foco na infecção pelo vírus Zika (ZIKV) em gestantes que apresentaram exantema durante a gestação, sendo observado que as crianças expostas à infecção congênita são diretamente afetadas pelo surto atual, apresentando alterações cognitivas e neurológicas importantes e/ou microcefalia, comprometendo assim o desenvolvimento dessas crianças. Com o intuito de se obter um diagnóstico cada vez mais precoce da infecção pelo ZIKV, alguns centros têm utilizado a sorologia para rastreamento, porém os seus resultados são de difícil interpretação em área endêmica, já que tem se observado reação cruzada com outros flavivírus como dengue por exemplo. Assim, este projeto visa identificar, via ensaio molecular (reação em cadeia da polimerase), a presença da infecção por ZIKV em amostras biológicas como sangue periférico, urina e leite de gestantes com exantema e/ou de seus recém-nascidos (sangue e urina). Para tal, nesse estudo de corte transversal, a ser conduzido no período de 2016-2019 (com estimativa de 200 voluntários), serão recrutados na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HUAP-UFF gestantes de qualquer idade e tempo de gestação com exantema, provenientes da rede pública de saúde de Niterói. Serão realizados os ensaios de RT-PCR qualitativos para ZIKV em todas as amostras de sangue periférico, urina e leite das gestantes que apresentaram exantema na gravidez, e em

**Endereço:** Rua Marquês de Paraná, 303 4º Andar  
**Bairro:** Centro **CEP:** 24.030-210  
**UF:** RJ **Município:** NITERÓI  
**Telefone:** (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica@vm.uff.br

Página 11 de 20

Continuação do Parecer: 1.002.055

Reformulou o regulamento do biorepositório.  
Reapresentou os termos de assentimento e TCLE.

**Recomendações:**

Recomenda-se que a palavra paciente seja substituído por participante e/ou menor (quando aplicável) nos TCLEs.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_840479.pdf	08/02/2017 20:44:44		Acelto
Outros	Resposta_Parecer_31012017.pdf	08/02/2017 20:43:19	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEs_Assentimentos_Zika_Lab_v3_08 022017.pdf	08/02/2017 20:42:51	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_Lab_CEP_v3_08022017.p df	08/02/2017 20:42:01	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Acelto
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_Zika_Lab_09122016.pdf	13/01/2017 06:50:59	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Acelto
Outros	Termo_de_Outorga_FAPERJ.pdf	13/01/2017 06:49:07	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Bioreposit_LAMAP_1201 2017.pdf	13/01/2017 06:42:52	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 4º Andar  
Bairro: Centro CEP: 24.030-210  
UF: RJ Município: NITERÓI  
Telefone: (21)2029-9189 Fax: (21)2029-9189 E-mail: etica@vms.uff.br

## 7.2. Anexo B – Termos de consentimento e assentimento.

### Modelo 1: Para as gestantes maiores de 18 anos de idade

Pesquisadora responsável: Profa. Claudete A. Araújo Cardoso

Instituição a que pertence a pesquisadora responsável: Faculdade de Medicina-UFF

Telefones para contato: (21) 3674-7282 e (21) 99497-2575.

Identificação da participante da pesquisa (iniciais do nome): \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos

R.G. \_\_\_\_\_

Responsável legal (quando for o caso):

\_\_\_\_\_

R.G. responsável legal:

\_\_\_\_\_

A Sra está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa “**Rastreamento molecular para o ZIKV em gestantes no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense**”, de responsabilidade da pesquisadora Profa. Claudete A. Araújo Cardoso.

O objetivo deste documento é fornecer informações sobre essa pesquisa. Aqui está explicado em detalhes, como o estudo será feito. Sua participação neste trabalho é voluntária. Isto quer dizer que você pode ou não querer participar, mas se concordar, poderá desistir de participar a qualquer hora. Se quiser participar desta pesquisa, vamos pedir que você assine duas vias deste documento, uma delas ficará guardada com a gente e a outra com você.

A infecção pelo ZIKV vem causando doenças em muitas pessoas em nosso país e na nossa comunidade. O vírus chega no corpo da gente pela picada do *mosquito Aedes aegypti*. A doença pode causar nas pessoas febre, dor nas articulações e manchas pelo corpo que podem coçar. A doença se cura sozinha, e geralmente não causa prejuízos para a gente. O problema aparece quando a infecção pelo zika ocorre durante a gravidez, podendo o vírus passar para o bebê ainda dentro da barriga da mãe, com aparecimento de problemas no cérebro em formação do bebê. Na maioria dos casos, a pessoa pode ter a infecção por Zika e não sentir nada, daí é importante a gente ver também em algumas pessoas que não sentem nada se elas têm alguma alteração que mostre a infecção pelo vírus.

Você foi encaminhada para o nosso hospital porque, provavelmente, apresentou algumas manchas na pele que parece com infecção viral e por isso, deve ser examinada com cuidado.

Queremos saber se você teve ou não infecção pelo ZIKV durante esta gravidez. Para isso precisamos coletar sangue e urina se você estiver com as manchas vermelhas no corpo agora. Porém, se tiver apresentado manchas anteriormente, nós iremos te acompanhar nas consultas médicas e no dia do seu parto coletaremos suas amostras de sangue, urina e leite materno e também sangue e urina do seu neném para que possamos ver se ele apresenta o vírus no seu corpo.

Vamos utilizar uma parte do sangue coletado para exames de rotina para saber se você tem Zika. Para fazermos os exames de sangue nós vamos precisar coletar 5 mL de sangue e para os exames de urina vamos obter cerca de 10mL. Ainda coletaremos cerca de 5 mL do leite materno para confirmação da infecção ou não.

Ao nascer o seu bebê será submetido a exame clínico de rotina, feito pelos médicos pediatras, com medida do tamanho da cabecinha no momento do parto e depois de 24 horas do nascimento, e testes de laboratório para o diagnóstico de infecção causada pelo Zika, incluindo 2 mL de sangue e 2mL de urina. A coleta será realizada pelo técnico de laboratório da UPC, profissional com muita experiência em coleta de sangue. As coletas feitas no pós-parto serão realizadas na maternidade do HUAP-UFF pela equipe de enfermagem, também com muita experiência em coletas de adultos e bebês.

Nós gostaríamos também de pedir a sua autorização para ver os resultados de seus exames laboratoriais, clínicos e de imagens descritos no seu prontuário e do seu bebê.

**Rubrica do pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Rubrica da paciente (ou seu responsável legal):** \_\_\_\_\_

A coleta de sangue pode ser um pouco incômoda, e pode até dar um pequeno sangramento com mancha roxa no lugar da coleta de sangue, mas não é diferente e nem tem maior risco do que as outras coletas de sangue que você faz nos seus exames de sangue de rotina. A pesquisadora responsável pelo estudo deve ficar sabendo caso você tenha algum problema com a coleta do sangue. Se for o caso, o Comitê de Ética em pesquisa também será comunicado.

Participar desse estudo não aumenta riscos ou benefícios para você ou para o seu bebê, pois participar ou não, não muda a forma como você ou seu bebê serão acompanhados nessa instituição. Sua identificação e de seu bebê serão mantidos em segredo durante a pesquisa. Ainda, nós mantemos o compromisso de tornar público os resultados desta pesquisa científica.

Antes de você começar a participar do estudo, se você tem a confirmação da infecção pelo ZIKV e caso queira, terá a oportunidade de conversar com a assistente social do serviço para falar com ela sobre as suas dúvidas, os seus anseios e as suas dificuldades em lidar com a situação de infecção pelo ZIKV. Você também terá liberdade para tratar desses assuntos com a Dra Claudete A. Araújo Cardoso, que estará no ambulatório durante as consultas e também poderá ser contactada pelo telefone (21) 99497-2575.

Você não precisará pagar para fazer parte do estudo, e também não receberá remuneração por participar. No entanto, está garantido a você o ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consulta e exames.

Caso você concorde em participar do estudo e autorize a coleta de material biológico, esse material será armazenado no Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense (LAMAP-UFF) mediante a sua autorização por escrito.

Você tem total liberdade de retirar a autorização quanto à guarda e uso do material biológico a qualquer momento, sem prejuízo para você e/ou para o (a) seu (ua) filho (a). As informações que esse estudo pode nos dar poderão ser utilizadas em estudos no futuro. Em caso de surgimento de outro estudo no futuro, nós vamos pedir uma nova permissão ao Comitê de Ética em Pesquisa e vamos chamar você novamente para convidá-la para participar do novo estudo. Caso você concorde, deverá assinar um novo termo de consentimento para a nova pesquisa.

Em caso de problemas causados pela sua participação no projeto de pesquisa, você terá direito de assistência total gratuita como participante da pesquisa, além do direito à indenização, garantidos pela pesquisadora responsável pelo estudo.

Se você tiver qualquer dúvida sobre esta pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, a Profa. Claudete A. Araújo Cardoso, no Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense (LAMAP-UFF), pelos telefones (21) 3674-7282 e (21) 99497-2575, a fim de esclarecer as suas questões.

**Rubrica do pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Rubrica da paciente (ou seu responsável legal):** \_\_\_\_\_

Outra forma de contato para falar das suas dúvidas é através do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense, situado à Rua Marquês de Paraná, 303, quarto andar, prédio anexo ao HUAP. O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê formado por um grupo de vários profissionais que se reúne para avaliar os projetos e garantir que os mesmos não trazem nenhum dano aos participantes das pesquisas. O seu horário de funcionamento é nas terças e quintas de 10 a 16 horas, e o contato pode ser pessoal ou pelo telefone (21) 2629-9189.

Você e a pesquisadora responsável pelo estudo deverão rubricar todas as folhas do termo de consentimento livre e esclarecido, colocando a sua assinatura na última página do referido termo.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, declaro ter sido informada e concordo em participar, como voluntária, do projeto de pesquisa acima descrito.

Niterói, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_

Testemunha \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Concordância com o armazenamento de material biológico:

Eu concordo com o armazenamento de material biológico meu.

Niterói,

(Assinatura) (Nome) Ou:

Eu não concordo com o armazenamento de material biológico da minha filha.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Niterói, \_\_\_\_\_

(Assinatura)

(Nome)