

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

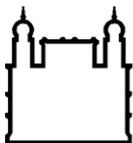
Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EFETORA E DE MEMÓRIA DE PACIENTES
INFECTADOS OU COM HISTÓRICO DE INFECÇÃO POR DENV E ZIKV

JÉSSICA BADOLATO CORRÊA DA SILVA

Rio de Janeiro

Agosto de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JÉSSICA BADOLATO CORRÊA DA SILVA

Avaliação da resposta imune efetora e de memória de pacientes infectados ou com histórico de infecção por DENV e ZIKV

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

Orientadora: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Dr. Josué da Costa Lima Junior

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2020

Badolato Corrêa da Silva, Jessica Badolato Corrêa da Silva.

Avaliação da resposta imune efetora e de memória de pacientes infectados ou com histórico de infecção por DENV e ZIKV / Jessica Badolato Corrêa da Silva Badolato Corrêa da Silva. - Rio de Janeiro, 2020.
259 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

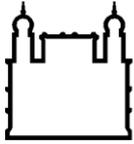
Orientadora: Luzia Maria de Oliveira Pinto.

Co-orientador: Josué da Costa Lima Junior.

Bibliografia: f. 206-221

1. Coinfecção. 2. Linfócitos T. 3. Memória Imunológica. 4. Peptídeos lineares do ZIKV. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: JÉSSICA BADOLATO CORRÊA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EFETORA E DE MEMÓRIA DE PACIENTES INFECTADOS OU COM HISTÓRICO DE INFECÇÃO POR DENV E ZIKV

ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Dr. Josué da Costa Lima Junior

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Fernanda Heloise Cortês – IOC/FIOCRUZ-RJ - Presidente

Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos – IFF/FIOCRUZ-RJ

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho – IRR/FIOCRUZ-Minas

Prof. Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira – IOC/FIOCRUZ-RJ

Prof. Dra. Vera Carolina Bordallo Bittencourt - UNIRIO

Rio de Janeiro, 17 de Agosto de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos participantes do estudo, os quais doam uma parte de si em prol da melhoria da qualidade de vida de outrem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me guiado e me sustentado ao longo desta jornada.

Aos meus familiares, por todo o apoio, carinho, suporte e compreensão. Obrigada por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditava, me apoiarem e sempre investirem no meu futuro. Foi graças a todo o incentivo que recebi durante estes anos que hoje posso celebrar este marco. Um agradecimento especial para a minha mãe, a razão do meu viver e meu exemplo diário de força e superação.

Ao meu marido, Reinaldo Alias, por assumir e viver as minhas escolhas como se fossem as dele e por fazer dos momentos que passamos juntos, os mais bonitos da minha vida.

À família LIV pelo enorme prazer de trabalhar ao lado de de pessoas maravilhosas, em especial ao Juan, Thiara, Iury e Débora, por serem muito mais do que parceiros de laboratório e sim parceiros para a vida toda. Agradeço também às chefes de laboratório Dra. Elzinandes Leal de Azeredo e Dra. Flavia Barreto dos Santos.

À Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, pela confiança em me deixar fazer parte de um projeto tão bonito, e por ser uma das mulheres com múltiplas versões nas quais me espelho para o futuro. As versões de pesquisadora, filha e mãe de excelência. Obrigada pelo carinho e por ser muito mais do que uma orientadora.

Ao Dr. Josué da Costa Lima Junior e ao Laboratório de Imunoparasitologia pela parceria e auxílio.

Ao Dr. Rodrigo Nunes e Dra. Patrícia Neves, pela colaboração com a predição e síntese dos peptídeos lineares de linfócitos B do ZIKV.

À Dra. Daniela Sweiskopf e Dr. Alessandro Sette, pela colaboração com a predição e síntese dos megapools de peptídeos do ZIKV.

À Dra. Claudete Aparecida Araújo Cardoso e a Fabiane Rabe Carvalho pela colaboração e a realização de um trabalho tão bonito e delicado com o acompanhamento das crianças com microcefalia pelo ZIKV.

Aos médicos colaboradores das epidemias, Dr. Rivaldo Venâncio da Costa, Dr. Luis José a e Dr. Paulo Vieira, assim como a todos os pacientes voluntários, ao passo que sem eles, esse trabalho não seria realizado.

Aos componentes da banca por aceitarem o convite, em especial ao Dra. Fernanda Heloise Cortez por realizar muito mais do que uma revisão, e sim contribuir para um aprendizado cada vez maior, sempre de forma muita paciência e cuidado.

À plataforma de Citometria de Fluxo e EliSpot, por nos auxiliarem de modo eficaz sempre que necessário.

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

Ao IOC/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

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

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

Marie Curie

RESUMO

Epidemias ocasionadas pelo ZIKV em regiões endêmicas de DENV favoreceram a ocorrência de coinfeções. Como objetivo inicial deste estudo, buscamos comparar o *status* de ativação de linfócitos T de pacientes mono ou coinfectados por DENV e/ou ZIKV. Para isso, utilizamos pacientes agudos mono infectados por DENV (n=6) ou ZIKV (n=4), e coinfectados por DENV/ZIKV (n=7). O método de citometria de fluxo foi utilizado para avaliar a expressão de CCR5, CX3CR1 e CCR3 e a produção intracelular de IFN- γ , TNF- α e IL-2. As células produtoras de IFN- γ foram detectadas pelo ELISPOT após estimulação *in vitro* com proteína NS1 DENV (1 a 4). Como resultados, observamos aumento nas frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CCR5, CX3CR1 e CCR3 nos três grupos de pacientes, sugerindo semelhanças nos padrões migratórios e funcionais dos linfócitos T nas mono- e coinfeções. Ainda, observamos menor capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T CD4⁺ na coinfeção comparado às monoinfeções. Por fim, detectamos menor magnitude de resposta ao NS1 do DENV nos pacientes agudos mono- ou coinfectados comparados aos doadores saudáveis exposto a dengue, sugerindo um perfil transitório de imunossupressão na fase aguda das infecções. Na segunda parte, buscamos avaliar a resposta de memória imunológica de linfócitos T de mulheres (n=5), mães infectadas na gravidez (n=21) e filhos expostos ao ZIKV pela via transplacentária (n=18). Mães e crianças foram subdivididas com base no desfecho clínico da criança. Para isso, foram utilizadas metodologias de citometria de fluxo e ELISPOT para avaliação de linfócitos T estimuladas *in vitro* com peptídeos do ZIKV. Como resultado, observamos alta frequência de linfócitos T CD127^{low}Tbet^{neg}GATA-3⁺ nas mães e crianças, sugerindo que essas células estariam contribuindo para o desenvolvimento da resposta humoral nesses indivíduos. Ainda, alta frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD107a e IFN- γ em todos os indivíduos, indicando que os linfócitos T CD4⁺ mantêm um perfil de memória de longa duração, enquanto que nos linfócitos T CD8⁺ observamos um perfil de memória de curta duração. Ainda, demonstramos que os linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} são os principais produtores de IFN- γ . Como última parte deste estudo, devido à alta similaridade entre ZIKV e DENV, a confirmação do diagnóstico utilizando os kits comerciais existentes é um desafio. Desta forma, buscamos predizer epítopos lineares das proteínas E, NS1 e NS5 do ZIKV para linfócitos B e avaliar sua capacidade de ligação ao IgG total de doadores com histórico de infecção por ZIKV ou DENV e pacientes infectados pelo DENV. Para isso, utilizamos mães com histórico de ZIKV (n=20) e pacientes com dengue ou com histórico de dengue (n=18). A predição e a avaliação do grau de conservação dos peptídeos lineares foi realizada utilizando os programas de predição BepiPred e EMINI. Detecção da capacidade de ligação dos peptídeos às IgG séricas foi feita por ELISA. Como resultado, dos 22 peptídeos preditos, 5 apresentaram grau de conservação <50%, os quais foram sintetizados. A detecção desses peptídeos por IgG séricas destes pacientes indicou que apenas o peptídeo NS1₈₋₁₅ foi significativamente capaz de diferenciar os doadores imunes ao ZIKV dos ao DENV. Destacamos como contribuições desse estudo envolvem as demonstrações de que a resposta imunológica mediada por linfócitos T CD4⁺ na coinfeção por DENV e ZIKV apresentou a capacidade de menor produção de citocinas pró-inflamatórias quando comparados às monoinfeções; geração de linfócitos T CD4⁺ de memória de longa duração após a infecção pelo ZIKV, mas aparentemente linfócitos T CD8⁺ de curta-duração; e de que o peptídeo NS1₈₋₁₅ do ZIKV seria um candidato potencial para ensaios diagnósticos futuros.

Palavras-chaves: Coinfeção; Linfócitos T; Memória Imunológica Celular; Peptídeos lineares do ZIKV

ABSTRACT

Epidemics caused by ZIKV in endemic regions of DENV favored the occurrence of coinfections. As an initial objective of this study, we sought to compare the activation status of T lymphocytes from patients mono or coinfecting by DENV and/or ZIKV. For this, we used acute patients monoinfected by DENV (n=6) or ZIKV (n=4), and coinfecting by DENV/ZIKV (n = 7). The flow cytometry method was used to evaluate the expression of CCR5, CX3CR1 and CCR3 and the intracellular production of IFN- γ , TNF- α and IL-2. IFN- γ producing cells were detected by ELISPOT after in vitro stimulation with NS1 DENV (1 to 4) protein. As a result, we observed an increase in frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes expressing CCR5, CX3CR1 and CCR3 in the three groups of patients, suggesting similarities in the migratory and functional patterns of T lymphocytes in mono and coinfections. In addition, we observed a lower capacity of production of pro-inflammatory cytokines by CD4⁺ T lymphocytes in coinfection compared to mono-infections. Finally, we detected a lower magnitude of response to NS1 of DENV in acute mono or coinfecting patients compared to healthy donors exposed to dengue, suggesting a transient immunosuppression profile in the acute phase of infections. In the second part, we sought to assess the immune memory response of T lymphocytes from women (n = 5), mothers infected during pregnancy (n = 21) and children exposed to ZIKV via the transplacental route (n = 18). Mothers and children were subdivided based on the child's clinical outcome. For that, flow cytometry and ELISPOT methodologies were used to evaluate T lymphocytes stimulated in vitro with ZIKV peptides. As a result, we observed a high frequency of CD127^{low}Tbet^{neg}GATA-3⁺ T lymphocytes in mothers and children, suggesting that these cells are contributing to the development of the humoral response in these individuals. Also, high frequency of CD4⁺ T lymphocytes expressing CD107a and IFN- γ in all individuals, indicating that CD4⁺ T lymphocytes maintain a long-term memory profile, whereas in CD8⁺ T-lymphocytes we observe a short-term memory profile. Furthermore, we demonstrate that CD4⁺ T_{EMRA} lymphocytes are the main producers of IFN- γ . As a final part of this study, due to the high similarity between ZIKV and DENV, confirming the diagnosis using existing commercial kits is a challenge. Thus, we seek to predict linear epitopes of ZIKV E, NS1 and NS5 proteins for B lymphocytes and to evaluate their ability to bind to total IgG from donors with a history of ZIKV or DENV infection and patients infected by DENV. For this, we used mothers with a history of ZIKV (n=20) and patients with dengue or a history of dengue (n=18). The prediction and evaluation of the degree of conservation of linear peptides was performed using the BepiPred and EMINI prediction programs. Detection of the peptides' binding capacity to serum IgG was performed by ELISA. As a result, of the 22 predicted peptides, 5 had a conservation degree <50%, which were synthesized. The detection of these peptides by serum IgG in these patients indicated that only the NS1₈₋₁₅ peptide was significantly capable of differentiating donors immune to ZIKV from those to DENV. We highlight how the contributions of this study involve the demonstrations that the immune response mediated by CD4⁺ T lymphocytes in the coinfection by DENV and ZIKV presented the capacity of lower production of pro-inflammatory cytokines when compared to mono-infections; generation of CD4⁺ T lymphocytes from long-term memory after ZIKV infection, but apparently short-term CD8⁺ T-lymphocytes; and that the ZIKV NS1₈₋₁₅ peptide would be a potential candidate for future diagnostic assays.

Keywords: Coinfection; T cells; Cellular Immunological Memory; ZIKV linear peptides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Casos notificados de dengue no período de 1986 até 2019.	4
Figura 1.2. Genoma dos flavivírus.	10
Figura 1.3. Classificação dos casos de dengue e seus níveis de gravidade.	16
Figura 1.4. Representação esquemática da cinética de infecções por flavivírus.	52
Figura 4.1. Desenho experimental do estudo.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Vacinas candidatas para dengue em testes clínicos e pré-clínicos. 48

Quadro 1.2. Vacinas candidatas para zika em testes clínicos e pré-clínicos. 52

LISTA DE AVREVIATURA E SIGLAS

ADE = Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*)

APC = Célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*)

C = Capsídeo

CCL5/RANTES = Ligante 5 de CC quimiocina/regulada sob ativação expressa e

CCR5 = Receptor de quimiocina do tipo CC 5

CCR7 = Receptor de quimiocina do tipo CC 7

CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

CHIKV = Vírus Chikungunya

CLA = Receptor associado a antígeno leucocitário (do inglês, *leucocyte-associated antigen receptor*)

CRISPR-Cas9 = Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

Ct = do inglês, *Cycle Threshold*

CTL = linfócito T citotóxico

CX3CR1 = Receptor para família CX3C quimiocina

CXCR3 = Receptor de quimiocina do tipo CXC 3

CXCR6 = Receptor de quimiocina do tipo CXC 6

DC = Células dendríticas

DC-SIGN = Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de célula dendrítica (do inglês *DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin*)

DENV = Vírus da 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

EDE = Dímero do envelope (do inglês, *envelope dimer epitope*)

EDI = Domínio I da proteína E

EDII = Domínio II da proteína E

EDIII = Domínio III proteína E

ELISA = Ensaio imuno-enzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FcR γ = Receptor para porção Fc de anticorpos classe γ (G)

FD = Febre do Dengue

FHD = Febre Hemorrágica do Dengue
FLE = Peptídeos do loop de fusão (do inglês, *fusion loop epitope*)
HLA = Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *Human leukocyte antigen*)
ICAM3 = Molécula de adesão intercelular 3 (do inglês, *Intercellular adhesion molecule 3*)
IFN = Interferon
IFNAR = Receptor de IFN alfa/beta (do inglês, *interferon alpha/beta receptor*)
IFN- α = Interferon alfa
IFN- β = Interferon beta
IFN- γ = Interferon gama
IgG = Imunoglobulina G
IgM = Imunoglobulina M
IL-13 = Interleucina -13
IL-2 = Interleucina -2
IL-4 = Interleucina -4
IL-5 = Interleucina -5
IL-7 = Interleucina - 7
IRF = Fatores reguladores de interferon (do inglês, *Interferon regulatory factors*)
ISG = Genes estimulados por interferon (do inglês, *interferon stimulated genes*)
JEV = Vírus da Encefalite Japonesa.
KIR = Receptores de células NK semelhantes a imunoglobulinas (do inglês, *Killer cell immunoglobulin-like receptors*)
LCs = Células de Langerhans
L-SIGN = Integrina de captura de ICAM-3 específica de linfonodo/fígado
MC = Macrófagos
MHC = Complexo de Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)
NF- κ B = Fator nuclear kapa beta (do inglês, *nuclear factor kappa beta*)
NK = Natural *Killer*.
NS = Proteína não-estrutural.
OFC = Cefálico Occipito-Frontal
OMS = Organização Mundial de Saúde
OPAS = Organização Pan-Americana de Saúde
PBMCs = Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).
PIV = Vacina de vírus inativado purificado

PP = Pressão de Pulso
prM = Pré membrana
pM = Precursor da proteína M
Proteína C = Proteína do Capsídeo
Proteína E = Proteína do Envelope
Proteína M = Proteína de Membrana
PRRs = Receptores de reconhecimento de padrões
RE = Retículo Endoplasmático
RIG = Receptor indutor do gene de ácido retinóico-I (do inglês, *retinoic acid-inducible gene-1 receptor*)
RLRs = Receptores do tipo RIG
RNA = Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid).
RT-PCR = Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa
SCD = Síndrome do Choque do Dengue
SCZ = Síndrome Congenita do Zika
SE = Semana Epidemiológica
SfRNA = RNA subgenômico do flavivírus
SGB = Síndrome de Guillain-Barré
SVS/MS = Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde
TAM = Família dos receptores de tirosina quinase (do inglês, *receptor tyrosine kinases*)
TBEV = Vírus da encefalite transmitida por carrapatos (do inglês, *Tick-borne encephalitis vírus*)
T_{CM} = Linfócitos T de memória central
TCR = Receptor de Célula T
TDLAV = Vacinas tetravalentes atenuadas de dengue (do inglês, *tetravalent dengue attenuated vaccines*)
T_{EM} = Linfócitos T de memória efetora
T_{EMRA} = Linfócitos T de memória efetora reexpressando o CD45RA
Th = fenótipo T *helper*.
TIM = Família dos receptores de fosfatidilserina de superfície celular (do inglês, *cell surface phosphatidylserine receptors*)
TLR = Receptores semelhantes a Toll
T_N = Linfócitos T naives
TNF- α = Fator de necrose tumoral α
TRB = CDR3 da cadeia β do TCR

UF = Unidade Federada

UFMS = Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

UTR = Regiões não codificantes (do inglês, *untranslated region*)

WNV = Vírus do Oeste do Nilo (do inglês, *West Nile vírus*)

YFV = Vírus da Febre Amarela.

ZIKV = Vírus Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico, epidemiologia e fatores determinantes para a expansão geográfica de dengue e zika no Brasil e no Mundo	1
1.1.1 Vírus Dengue (DENV).....	1
1.1.2. Vírus Zika (ZIKV)	4
1.1.3. Coinfecção DENV e ZIKV	7
1.2 Virologia, replicação, receptores de entrada e tropismo celular de DENV e ZIKV	8
1.3 Transmissão.....	13
1.4 Manifestações clínicas	15
1.4.1 Dengue	15
1.4.2 Zika	18
1.4.3 Sintomatologia na coinfecção Dengue/Zika	21
1.5 Defesa imunológica contra as infecções por DENV e ZIKV em humanos...21	
1.5.1 Resposta Imunológica Celular Adaptativa.....	24
1.5.2 Resposta Celular de reatividade-cruzada e o fenômeno do Pecado antigênico original	31
1.5.3 Resposta Imune Humoral versus facilitação da Infecção dependente de Anticorpo.....	38
1.5.4 Memória Imunológica e produção de vacinas contra DENV e ZIKV baseada na resposta de linfócitos T	41
1.6 Diagnóstico diferencial entre DENV e ZIKV: um desafio	52
2 JUSTIFICATIVA	61
3 OBJETIVOS	62
3.1 Objetivo Geral	62
3.2 Objetivo Específicos.....	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63

4.1 Desenho Experimental	63
5 RESULTADOS	64
Artigo 1: Resposta de linfócitos T humanos às infecções pelos vírus Dengue e Zika em comparação com a coinfeção por Dengue/Zika	64
Artigo 2: Diferença na longevidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ em uma coorte de mães e crianças com histórico de infecção por ZIKV	80
Artigo 3: Detecção de epítomos lineares de células B do ZIKV capazes de se ligar a IgG em doadores imunes ao ZIKV	129
Artigo 4: Papel duplo dos linfócitos T humanos após infecção sequencial ou concomitante por DENV e ZIKV	156
6 DISCUSSÃO	182
7 CONCLUSÃO	203
8 PERSPECTIVAS	205
9 REFERÊNCIAS	206
10 ANEXOS.....	222
Anexo A – Artigos publicados em colaboração durante a tese.....	222
Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido	229
Anexo C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	230

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico, epidemiologia e fatores determinantes para a expansão geográfica de dengue e zika no Brasil e no Mundo

1.1.1 Vírus Dengue (DENV)

Segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPAS/OMS), a incidência da dengue tem crescido drasticamente em todo o mundo nas últimas décadas. Estimativas recentes indicam que 390 milhões de infecções ocorrem por ano, das quais 96 milhões se manifestam clinicamente. A doença apresenta uma prevalência de 3,9 bilhões infectados em mais de 100 países da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. As regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais afetadas. Em 2015, 2,35 milhões de casos de dengue foram notificados apenas nas Américas, sendo 10.200 casos na forma grave da doença, ocasionando 1.181 mortes. Anualmente, estima-se que 500 mil pessoas com dengue grave necessitam de hospitalização, com uma taxa de 2,5% de mortalidade. Em todo o mundo, foi registrado um declínio de 28% nos casos de mortalidade entre 2010 e 2016, devido a uma melhora significativa no manejo clínico. No entanto, o número de casos continua a aumentar à medida que a doença se espalha para novas áreas, com ocorrência de surtos de caráter explosivo (OPAS/OMS, 2020).

Brathwaite e colaboradores (2012) descreveram uma trajetória dos surtos de dengue nas Américas de 1600 a 2010. A trajetória foi categorizada em quatro fases: introdução da dengue nas Américas (1600-1946); Plano continental para erradicação do *Ae. aegypti* (1947-1970), que foi bem-sucedida em 18 países continentais; Reinfestação do *Ae. aegypti* (1971-1999) causada pelo fracasso do programa de erradicação; e aumento da dispersão do *Ae. aegypti* e circulação do DENV (2000–2010), caracterizada por um aumento acentuado no número de surtos.

Segundo a OPAS/OMS, 2016 foi caracterizado por grandes surtos de dengue em todo o mundo. As Américas registraram mais de 2,38 milhões de casos, onde o Brasil contribuiu com quase 1,5 milhão de casos com 1.032 mortes (OPAS/OMS, 2020). Em 2017, houve uma diminuição de 73% no número de

casos de dengue nas Américas – 2,1 milhões de casos em 2016 foi reduzido para 584.263 casos em 2017. Da mesma forma, uma redução de 53% nos casos de dengue grave também foi registrada durante 2017. No 1º trimestre de 2018, uma redução de 27% dos casos foi observada em comparação com o mesmo período de 2017 (OPAS/OMS, 2020).

Nas Américas, um surto importante ocorreu durante o período de 2011 a 2017, coincidentemente, após grandes movimentos de pessoas devido 4 eventos esportivos globais: Jogos Pan-Americanos de 2011 em Guadalajara (México), Copa das Confederações de 2013, Copa do Mundo de 2014 e Olimpíadas de 2016, todas no Brasil. Esses surtos se refletiram nas altas taxas de mortalidade por dengue (Salles et al., 2018).

No Brasil, os primeiros relatos da dengue foram descritos nos anos de 1685 e 1692, com uma epidemia que levou a 2.000 mortes. Desde 1981 e 1982, durante a primeira epidemia de dengue em Roraima, o *Ae. aegypti* persistiu no Brasil até os dias atuais e no período, os sorotipos DENV-1 e 4 foram isolados no território brasileiro. Em 1986, uma epidemia de dengue surgiu no Rio de Janeiro e em algumas áreas urbanas do nordeste do Brasil, com a circulação do DENV-1 e relatos de mais de 50.000 casos. Em 1990, DENV-2 foi introduzido no Rio de Janeiro, atingindo várias áreas do sudeste do Brasil (SVS/MS, 2010).

O vírus se espalhou por todo o país, com o maior número de casos relatados na região nordeste. Em 2000, o DENV-3 foi isolado no Rio de Janeiro, desencadeando uma nova epidemia de dengue entre 2001 e 2003 (SVS/MS, 2010). Em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos DENV-1, 2 e 3 (Barreto & Teixeira, 2008). A partir de 2006, enquanto o DENV-3 predominava, alguns estados apresentaram a recirculação do DENV-2, o que levou um aumento do número de casos graves e de hospitalizações em crianças, sobretudo no Nordeste. Em 2008, o DENV-2 causou novas epidemias em diversos estados, resultando em um dos cenários mais graves da doença no Brasil baseado no total de internações e óbitos (MS, 2015). Nos anos seguintes, o Brasil enfrentou epidemias marcadas pela reintrodução de outros sorotipos, como DENV-1 em 2010 e DENV-4 em 2013, bem como a introdução de outros arbovírus, como o ZIKV e CHIKV, nos anos de

2015 e 2016 (SVS/MS, 2020). O número de casos prováveis e óbitos por dengue nos anos de 2003 a 2019 no território brasileiro estão resumidos na figura 1.1.

O padrão de surtos epidêmicos da dengue que ocorrem a cada 3 a 5 anos, foi mantido no Brasil até 2010, quando passou a ocorrer a cada 2 anos. Isto pode ter acontecido devido ao movimento global de pessoas pelos eventos esportivos no país (Salles et al., 2018).

Em 2019, até a Semana Epidemiológica (SE) 34, foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue no país. Observou-se um aumento de 599,5% no número de casos prováveis em 2019, em comparação ao mesmo período de 2018. Análise da taxa de incidência de dengue (número de casos/100 mil habitantes) neste período, segundo regiões geográficas, evidencia que as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentam as maiores incidências: 1.196,1 casos/100 mil habitantes e 1.139,2 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Foram confirmados 591 óbitos e 486 (82,2%) estão em investigação. Os dados de 2020 de dengue são baseados nas notificações ocorridas entre as SE 1 e 3 (29/12/2019 a 18/01/2020), disponíveis no Sinan Online. Até esse período, foram notificados 30.763 casos prováveis de dengue no país (14,6 casos/100 mil habitantes). A região Centro-Oeste apresentou 32,5 casos/100 mil habitantes, seguida das regiões Sul (28,86 casos/100 mil habitantes), Sudeste (15,1 casos/100 mil habitantes), Norte (10,6 casos/100 mil habitantes) e Nordeste (2,68 casos/100 mil habitantes). São Paulo concentra 33,4% dos casos prováveis do país (SVS – Boletim Epidemiológico 5 – jan. 2020).

Assim como a dengue, a emergência e a disseminação do ZIKV provavelmente foram facilitadas pelas tendências demográficas, sociais e tecnológicas globais, crescimento populacional, urbanização e globalização sem precedentes, combinadas com a falta de controle eficaz dos mosquitos nas áreas urbanas (Gubler, 2011; Russell, 2016).

Dengue e Zika vírus

Série Histórica de Casos Prováveis e Óbitos - Brasil 1986 a 2019

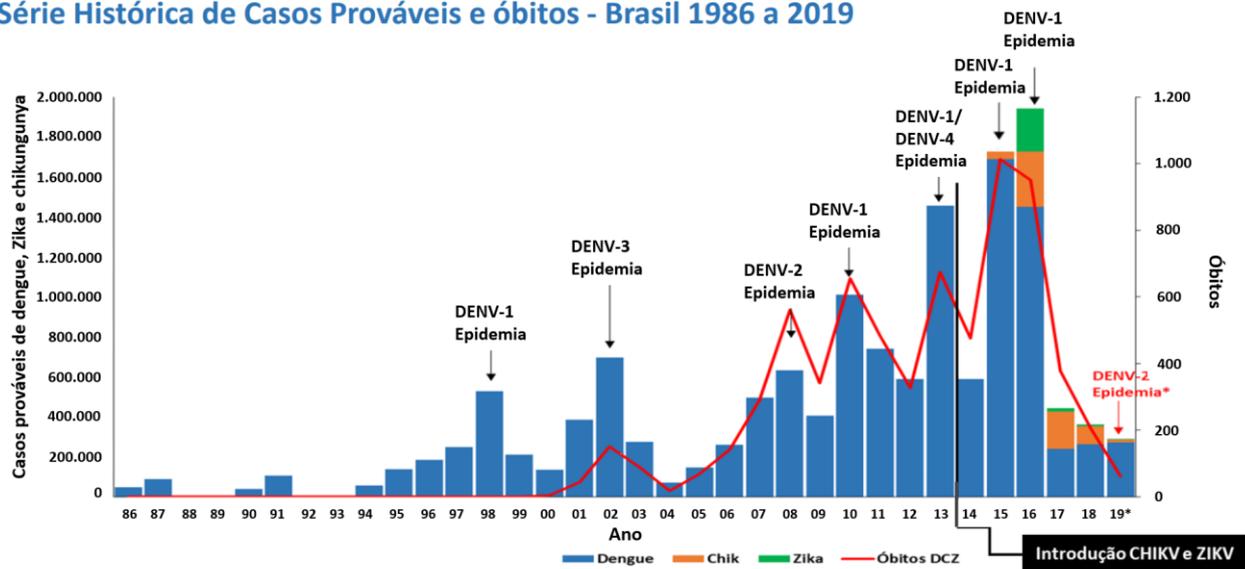


Figura 1.1. Casos notificados de dengue e zika no período de 1986 até 2019. Barras azuis representam o número de casos prováveis de dengue por ano. Barras laranjas representam o número de casos prováveis de chikungunya por ano. Barras verdes representam o número de casos prováveis de zika por ano. Linha vermelha o número de óbitos. Setas pretas, sorotipos prevalentes nas epidemias. Fonte: Sinan Online – Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2019.

1.1.2. Vírus Zika (ZIKV)

Vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez do sangue de um macaco *rhesus* febril na floresta Zika em Uganda em 1947, durante investigações sobre a ecologia da febre amarela (Dick et al., 1952). A primeira epidemia conhecida de ZIKV ocorreu nas ilhas Yap, na Micronésia, localizadas no Pacífico Ocidental, quando uma epidemia de doença semelhante à dengue foi relatada entre abril e maio de 2007. O surto foi relativamente pequeno (aproximadamente 5.000 infecções, afetando aproximadamente 75% da população) e a doença foi descrita como uma síndrome febril exantemática de intensidade leve com um elevado percentual de assintomáticos. Os médicos locais suspeitaram de uma etiologia diferente da dengue, quando as amostras foram enviadas para o Laboratório de Referência e Diagnóstico de Arbovírus do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (Fort Collins, CO), onde a infecção pelo ZIKV foi confirmada (Gubler et al., 2017).

Nenhuma outra transmissão epidêmica de ZIKV foi relatada até outubro de 2013, quando uma grande epidemia ocorreu em 2013/2014, envolvendo todas

as ilhas da Polinésia Francesa com mais de 30.000 casos. Nesta epidemia foram observados, pela primeira vez, casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB) e transmissão perinatal (Besnard et al., 2014; Oehler et al., 2014; Cao-Lormeau et al., 2016; Musso et al., 2018). Um alerta foi criado para o risco potencial de complicações congênitas por arbovírus, com base em relatos de encefalopatia, febre hemorrágica, óbito fetal, dentre outros, associados aos vírus chikungunya e DENV (de Oliveira & Vasconcelos, 2016). Análise retrospectiva dos nascidos vivos da Polinésia Francesa de março de 2014 a maio de 2015, identificou 17 casos de malformações do sistema nervoso central, incluindo microcefalia em fetos e recém-nascidos. Nenhuma das gestantes relatou sinais de infecção pelo ZIKV, mas quatro grávidas tiveram sorologia reagente para IgG anti-flavivírus, o que sugeriu infecção assintomática (CDC – Europa, 2015).

Em março de 2015, na Bahia, região nordeste do Brasil, pacientes encontravam-se internados em decorrência de um surto contínuo de uma doença caracterizada por febre, erupção cutânea maculopapular, dores musculares, dores articulares e conjuntivite. Análise molecular identificou o ZIKV em parte deles e as análises sequenciais das regiões da proteína do envelope do ZIKV mostraram 99% de identidade com um isolado da Polinésia Francesa (Campos et al., 2015; Zanluca et al., 2015) e o mesmo foi observado em amostras de soro obtidas no Rio Grande do Norte, região nordeste do Brasil, em março de 2015 (Zanluca et al., 2015). Há especulações substanciais de que o ZIKV foi introduzido no Brasil a partir da Copa do Mundo realizada entre junho e julho de 2014. Embora nenhum país do Pacífico tenha participado desse evento, é possível que espectadores de países endêmicos tenham participado da competição e introduzido o vírus no país (Musso, 2015; Bogoch et al., 2016).

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, a análise dos dados de 2015 apresenta limitações na representatividade, uma vez que tinha sido adotado um modelo de vigilância sentinela, com objetivo de detectar casos autóctones. Assim, desde os primeiros casos relatados, o Ministério da Saúde do Brasil estimou entre 440.000 a 1.300.000 casos de zika (CDC – Europa, 2015). O vírus se espalhou para vários países vizinhos, onde foram identificados surtos contínuos na América do Sul, como na Colômbia, Paraguai, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Guiana e Bolívia;

México na América do Norte; El Salvador, Guatemala, Panamá e Honduras na América Central; e os países e territórios do Caribe, Martinica, São Martinho, Porto Rico, Haiti, Barbados e Guadalupe (CDC – Europa, 2016).

Surpreendentemente, o surto no Brasil suscitou preocupações quanto ao aumento de 20 vezes na incidência e prevalência de 100/100.000 casos de nascidos vivos com microcefalia (Ventura et al., 2016). Análise mais recente no Brasil, utilizando definição mais precisa de microcefalia, sustentou uma relação temporal entre a infecção pelo ZIKV em mulheres gestantes durante o 1º trimestre e a microcefalia (de Oliveira et al., 2016). O RNA do ZIKV foi encontrado em amostras do líquido amniótico de duas mulheres grávidas com microcefalia fetal (MS, 2016). As duas mulheres apresentaram sintomas semelhantes ao zika nas 18º e 19º semanas de gestação. Frente a esse novo cenário, o Ministério da Saúde do Brasil declarou a epidemia de ZIKV como uma emergência em saúde pública de importância nacional (Kindhauser et al., 2016).

Em 2019, até a SE 33, foram registrados 9.813 casos prováveis de zika no país. No mesmo período de 2018, foram registrados 6.669 casos prováveis. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de zika segundo regiões geográficas, evidencia que as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte apresentaram os maiores valores: 6,7 casos/100 mil habitantes, 6,2 casos/100 mil habitantes e 4,9 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Em 2019, foram registrados 1.649 casos prováveis de zika em gestantes, sendo 447 casos confirmados. Foram confirmados dois óbitos por ZIKV no estado da Paraíba. Em 2020, até a SE 03 (29/12/2019 a 18/01/2020), foram notificados 85 casos prováveis de zika (0,04 casos/100 mil habitantes) no país. A região Norte apresentou a maior taxa de incidência (0,08 casos/100 mil habitantes), em seguida as regiões Centro-Oeste (0,07 casos/100 mil habitantes), Nordeste (0,06 casos/100 mil habitantes), Sul (0,03 casos/100 mil habitantes) e Sudeste (0,02 casos/100 mil habitantes) (SVS – Boletim Epidemiológico 5 – Jan. 2020). O número de casos prováveis de infecções por ZIKV no Brasil nos anos de 2015 a 2019 estão resumidos na figura 1.1.

1.1.3. Coinfecção DENV e ZIKV

O contínuo surgimento de diferentes arbovírus representa um sério desafio para a saúde pública, como vem sendo observado pelas recentes epidemias dos vírus chikungunya (CHIKV) e ZIKV, principalmente em ambientes urbanos de regiões endêmicas de dengue. Os três vírus compartilham os hospedeiros humanos e, principalmente, o *A. aegypti* como vetor. Assim, muitas regiões das Américas tem experimentado surtos simultâneos dessas arboviroses (Rodriguez-Morales, et al., 2016), assim como infecções concomitantes com dois ou mais vírus (revisado por Vogels, et al., 2019), por apresentarem fatores biológicos, ecológicos e econômicos comuns (Gardner, et al. 2018). Apesar do potencial dessa tendência, ainda sabemos pouco sobre as consequências das coinfeções.

Nosso grupo publicou em 2018 dados de 134 pacientes suspeitos de infecção por arbovírus na fase aguda. Destes, 107 confirmaram diagnóstico de infecção por DENV ou ZIKV durante a epidemia de 2016 em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A monoinfecção por DENV foi detectada pelo RNA viral em 51 amostras testadas; os RNA de DENV e ZIKV foram detectados simultaneamente em 18 amostras e a monoinfecção por ZIKV foi vista pela presença do RNA do ZIKV em 18 casos. O DENV-1 foi o sorotipo infectante predominante entre os pacientes mono- e coinfectados, seguido por DENV-4. Embora não tenhamos observado diferença estatística entre os diferentes grupos analisados, observamos uma tendência de menores valores de Cycle Threshold (Ct) pelo RT-PCR nos casos de coinfecção DENV/ZIKV quando comparados aos valores observados nos monoinfectados DENV ou ZIKV (Azeredo et al., 2018). Mais tarde, Estofolote e colaboradores (2019) publicaram dados de 1.254 pacientes oriundos de uma cidade hiperendêmica da dengue, localizada na região noroeste de São Paulo, onde 12 deles foram identificados como coinfectados por DENV/ZIKV, e outros 274 foram monoinfectados por DENV (Estofolote, et al., 2019).

Sabendo-se da possibilidade real das coinfeções, também é preciso entender como os seres humanos tornam-se co-infectados com múltiplos arbovírus. Ao usar sistemas de alimentação artificial por membrana, pesquisadores conseguiram expor mosquitos a repastos sanguíneos contendo

um ou vários arbovírus. Os estudos experimentais confirmaram que os mosquitos podem se tornar, simultaneamente ou sequencialmente, infectados com vários arbovírus e que todas as combinações de CHIKV, DENV e ZIKV podem, de fato, ser detectados na saliva de até 11,5% dos *A. aegypti* (Ruckert, et al., 2019; Vogels, et al., 2019). Interessantemente, uma população local de *A. aegypti* foi avaliada para determinar se era suscetível à infecção por cepas de DENV e ZIKV circulando no Brasil, bem como se a coinfeção modula a replicação ou interfere na competência do vetor. Verificou-se que quase todos os *A. aegypti* foram suscetíveis à coinfeção com os dois arbovírus e que a coinfeção influenciou fortemente a competência do vetor, com transmissão preferencial de ZIKV pela picada de *A. aegypti* ao hospedeiro vertebrado (Chaves et al., 2018).

Estudos vem sugerindo que os arbovírus relacionados exibem um nível de proteção cruzada e que, portanto, a exposição prévia a um vírus gera uma resposta a exposição sequencial a um segundo vírus, o que poderia diminuir a probabilidade de infecções sequenciais (Barba-Spaeth, et al., 2016; Priyamvada, et al., 2017). Compreender a dinâmica da resposta imune específica na coinfeção e em infecções sequenciais por arbovírus relacionados é um desafio que, se melhor entendido, ajudará a entender os mecanismos de proteção e patogênese do hospedeiro, facilitará o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico específicos e melhorará a vigilância epidemiológica, particularmente em áreas onde os flavivírus são endêmicos ou a vacinação contra a febre amarela é comum.

1.2 Virologia, replicação, receptores de entrada e tropismo celular de DENV e ZIKV

Os vírus dengue (DENV) e zika (ZIKV) pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. O DENV possui quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 ao 4) (Clyde et al., 2006; revisado por Rothman, 2011). As cepas dos sorotipos do DENV apresentam aproximadamente 98,1% a 99,0% de identidade entre suas sequências de aminoácidos, e os quatro sorotipos de DENV compartilham de 68,7% a 78,1% de identidade entre eles (Xu et al., 2016). O ZIKV possui apenas um sorotipo, apresentando duas linhagens distintas, a

Asiática e a Africana (Dowd et al., 2016). As cepas do ZIKV compartilham 99,2% de identidade e são comparáveis à identidade de sequência observada entre as diferentes cepas de DENV, que também apresentam linhagens. Entre os flavivírus humanos patogênicos, o DENV e o ZIKV estão mais intimamente relacionados entre si, com 55,1% a 56,3% de identidade de sequência de aminoácidos. Consequentemente, a literatura emergente indica semelhanças entre esses dois vírus em termos de interações entre os vírus e o sistema imunológico do hospedeiro (revisado por Ngonu & Shrestha, 2018).

Esses agentes são vírus envelopados com simetria icosaédrica e diâmetro de aproximadamente 50 nm. O DENV e o ZIKV possuem um genoma que consiste em uma única cadeia de RNA de polaridade positiva, de aproximadamente 10,8 kb de comprimento, com uma fase aberta de leitura que codifica uma única poliproteína. Esta poliproteína é clivada em três proteínas estruturais, capsídeo (C), da membrana (M) e do envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, além da presença de um peptídeo 2K, uma sequência formada por 17 aminoácidos, que une a NS2A a B. A poliproteína é clivada por proteases virais e do hospedeiro, conforme ilustrado na figura 1.2. No entanto, essa clivagem é incompleta, resultando na liberação de muitas partículas virais imaturas contendo prM (Zybert et al., 2008; Junjhon et al., 2008).

A proteína M regula a fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro. A proteína E está envolvida na ligação do receptor, fusão da membrana e montagem viral, além de ser o principal alvo dos anticorpos neutralizantes e contém cada um dos quatro epítopos antigênicos específicos para os sorotipos do DENV. Com base na estrutura cristalina do ectodomínio, a proteína E do DENV é composta por três domínios: Domínio I (EDI), que participa dos rearranjos estruturais da proteína E necessários para a fusão; o domínio II (EDII), que contém a alça de fusão envolvida na fusão dependente de pH das membranas do vírus e do hospedeiro; e o domínio III (EDIII) que inclui a região de ligação ao receptor (Modis et al., 2004; Modis et al., 2005).

As proteínas não-estruturais estão envolvidas no processamento da poliproteína viral, replicação e indução da resposta imune inata (Gack & Diamond, 2016). As proteínas NS1 de flavivírus como DENV, vírus do Oeste do

Nilo (West Nile virus, WNV) e vírus da febre amarela (yellow fever virus, YFV) já são bem descritas, no entanto, até o momento, pouco se sabe sobre a proteína NS1 do ZIKV. As proteínas NS1 possuem uma massa molecular de 46-55 kDa e estão presentes em duas variantes distintas (Muller & Young, 2013). A variante associada à membrana é encontrada principalmente como um dímero, e interage tanto com membranas intracelulares, como com as membranas do retículo endoplasmático, em vesículas empacotadoras e nas superfícies celulares (Winkler et al., 1988; Mackenzie, et al., 1996). Já a variante secretada apresenta-se como hexâmeros com formato de barril (Flamand et al., 1999). Conforme relatado para os vírus DENV e WNV, a proteína NS1 é secretada pelas células infectadas na corrente sanguínea, estimulando o sistema imunológico a produzir altos títulos de anticorpos específicos anti-NS1 (Alcon et al., 2002).

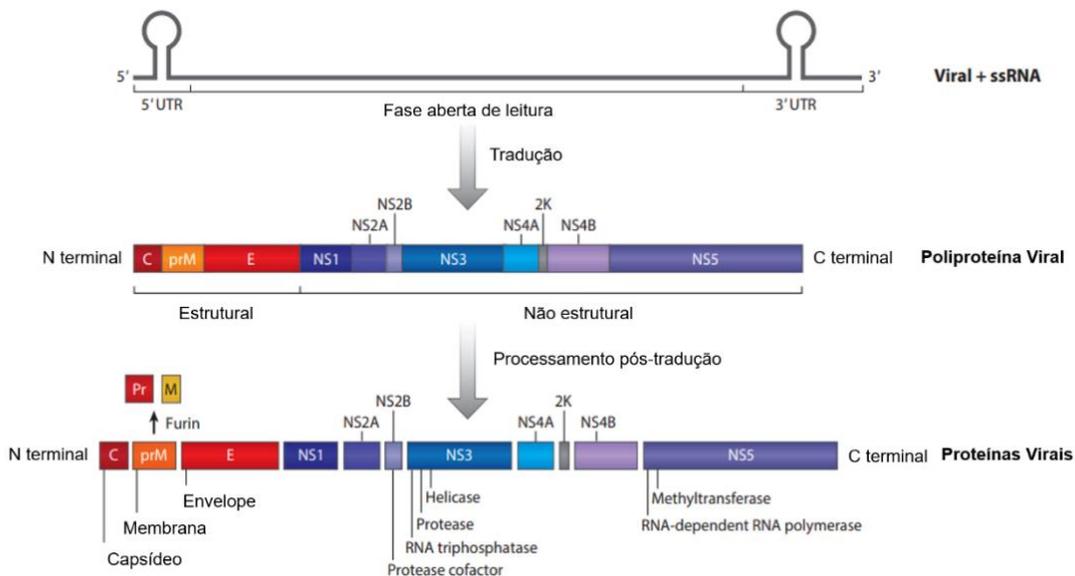


Figura 1.2. Genoma dos flavivírus. O genoma dos flavivírus é formado por uma molécula RNA fita simples com polaridade positiva, com aproximadamente 10.7 kb. A tradução resulta em uma poliproteína que ao ser clivada origina três proteínas estruturais na extremidade N terminal, e sete proteínas não estruturais, na extremidade C terminal. No processamento após a tradução são produzidas 10 proteínas virais: C, prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O peptídeo 2K é uma sequência formada por 17 aminoácidos que une a NS2A a B. Abreviações: C, capsídeo; E, envelope; NS, não estrutural; pr M, pré-membrana; ssRNA, RNA fita simples. Fonte: Adaptado de Ngono & Shresta. *Annu. Rev. Immunol.* 2018. 36:279–308.

Em particular, a proteína NS5, com aproximadamente 900 aminoácidos, é a maior e mais conservada das proteínas dos flavivírus. A NS5 codifica uma RNA polimerase dependente de RNA para replicação do genoma, metiltransferase para formação e metilação da porção 5' RNA e é um antagonista do interferon tipo I. A proteína NS3 codifica uma protease e associa-se ao NS2B (que atua

como um cofator) para formar o complexo de protease viral NS2B3. Além disso, antagoniza a via do interferon tipo I. Além de proteínas não-estruturais, as 5' e 3' UTRs fazem parte do complexo de replicação viral e o RNA subgenômico do flavivírus (sfRNA) codificado pela 3' UTR, também estão envolvidos na evasão viral da resposta imune inata (Bidet et al., 2014; Manokaran et al., 2015; Donald et al., 2016).

Como dito, a proteína E medeia a ligação e fusão do DENV e do ZIKV aos seus receptores de entrada nas células hospedeiras humanas, no entanto, a identidade precisa desses receptores permanece incerta. O DENV parece usar várias moléculas de superfície celular para se ligar e infectar as células alvo, dependendo do tipo celular. Várias moléculas candidatas, incluindo glicosaminoglicanos (Chen et al., 1997); lectinas do tipo C; a não-integrina de captura de ICAM3 células dendríticas-específica (dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN) e a integrina de captura de ICAM3 específica de fígado/linfonodo (liver/lymph node-specific ICAM3-grabbing integrin, L-SIGN) (Tassaneeritthep et al., 2003; Navarro-Sanchez et al., 2003; Dejnirattisai et al., 2011); receptor de manose (Miller et al., 2008); domínio mucina e imunoglobulina dos receptores de de fosfatidilserina linfócitos T (phosphatidylserine receptors T cell immunoglobulin and mucin domain, TIM) e Tyro3, Axl e Mertk (TAM) (Meertens et al., 2012); e o receptor fosfolipídeo CD300a (Carnec et al., 2015), foram propostos como receptores celulares para o DENV, baseado principalmente em estudos *in vitro* com linhagens celulares e células humanas primárias. A entrada também pode ocorrer através do processo conhecido como facilitação da infecção dependente de anticorpo (antibody-dependent enhancement, ADE). Em particular, virions apresentados como complexos imunes podem entrar nas células que expressam o receptor Fcγ (FcγR) (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Um dos membros da família TAM, Axl, também foi indicado como receptor de entrada do ZIKV em estudos com linhagens celulares e células humanas primárias. No entanto, estudos baseados em dados de genes em CRISPR-Cas9 de células progenitoras neurais humanas, culturas de organoides cerebrais (Wells et al., 2016) e camundongos geneticamente deficientes de Axl ou Axl e Merk não mostraram efeito destes receptores na infecção por ZIKV (Hastings et

al., 2017). Portanto, os receptores necessários para a infecção por DENV e ZIKV em humanos ainda são desconhecidos. As funções exatas dos vários receptores candidatos identificados até o momento não são bem descritas. Sendo assim, outros receptores, individualmente ou em várias combinações, de maneira dependente do tipo celular, podem servir como receptores de entrada que mediam a fusão ou como fatores de ligação que promovem a adsorção e internalização de vírus, levando a infecção produtiva ou não, podendo talvez influenciar no nível de infecção (Ngono & Shresta, 2018).

Em relação as células-alvo, o tropismo celular do DENV em humanos ainda não está totalmente definido. Além disso, é importante diferenciar as células infectadas daquelas que tem o antígeno viral endocitado ou fagocitado. Estudos de autópsia em humanos relataram que as células pertencentes à linhagem celular de monócitos/macrófagos/dendríticas no baço, linfonodos, pulmões, fígado, rim e estômago são as principais células-alvo de infecção pelo DENV (Jessie et al., 2004). Além disso, células endoteliais, hepatócitos e neurônios no cérebro são permissivos a infecção pelo DENV (Ramos et al., 1998; Couverlard et al., 1999). Em amostras de sangue periférico de pacientes infectados pelo DENV, monócitos foram identificados como as principais células alvo de infecção (Durbin et al., 2008). Nas amostras de biópsia de pele de doadores humanos não infectados, as células de Langerhans, as células dendríticas e os macrófagos puderam servir como hospedeiros celulares do DENV (Wu et al., 2000).

Estudos envolvendo amostras clínicas, cultura de células humanas e modelos não-humanos de primatas e camundongos, sugerem que ZIKV é pantrópico. Em amostras clínicas, a partir da metodologia de hibridização *in situ*, foi identificado células progenitoras neurais, células gliais, células epiteliais amnióticas, células mesenquimais fetais e células Hofbauer (macrófagos da placenta) como permissivas a infecção pelo ZIKV (revisado por Miner & Diamond, 2017). Estudos *ex vivo* e *in vitro* em células humanas também sugerem que o ZIKV se replica em astrócitos, trofoblastos, fibroblastos (placentário, uterino, pulmonar), células endoteliais, células epiteliais e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (revisado por Hou et al., 2017). Estudos baseados em análises por imuno-histoquímica, utilizaram amostras

clínicas e, também demonstraram imunorreatividade com anticorpos anti-E em neurônios, pneumócitos, hepatócitos e células epiteliais renais (Noronha et al., 2016; Martines et al., 2016). Estudos *in vitro* também demonstraram a presença da proteína E do ZIKV em podócitos glomerulares, células mesangiais, células estromais, pericitos da retina e células epiteliais pigmentadas, fibroblastos dérmicos e células dendríticas, queratinócitos epidérmicos e células endoteliais (glomerular, retinal). Em macacos *rhesus*, a hibridização *in situ* e imunohistoquímica de NS2B demonstraram que neurônios, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são permissivos a infecção. Os resultados em macacos diferiram quanto à replicação do ZIKV nos linfócitos B. Estudos independentes mostraram que ZIKV pode persistir no sistema nervoso central de macacos e no tecido linfóide por mais de 4 semanas após a infecção (revisado por Miner & Diamond, 2017; Ngonu & Shresta, 2018).

1.3 Transmissão

O DENV e o ZIKV são frequentemente transmitidos aos seres humanos pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, que adquirem o sangue virêmico quando realizam o repasto sanguíneo em humanos e animais, caracterizando os ciclos urbano e silvestre, respectivamente. Subespécies dos *Aedes*, *Ae. africanus*, *Ae. furcifer-taylori*, *Ae. dalzieli*, realizam repasto sanguíneo em primatas não-humanos (chimpanzés, macacos e babuínos). Primatas humanos podem ser afetados quando o ciclo silvestre se desloca para a área urbana. Neste caso, as subespécies de mosquitos do gênero *Aedes* envolvidos no repasto sanguíneo de humanos são os *Ae. aegypti* e *Ae. Albopictus* (Kraemer et al., 2015).

A transmissão não vetorial também pode ocorrer. Outras formas de transmissão já foram descritas, tanto para ZIKV como para DENV, dentre elas, a transfusional e vertical ou transplascentária. O DENV foi detectado em 75% das 12 mães infectadas que realizavam o aleitamento; portanto, a transmissão via amamentação é plausível (Arragain et al., 2017). Ao contrário da maioria dos outros flavivírus, a transmissão sexual foi descrita, até o momento, como uma via exclusiva do ZIKV (Besnard et al., 2014; Adibi et al., 2016; Barjas-Castro et al., 2016; Subissi et al., 2018; Counotte et al., 2018).

O primeiro caso descrito de transmissão sexual envolveu um americano, que contraiu a infecção pelo ZIKV enquanto trabalhava no Senegal em 2008 e depois, o transmitiu à sua esposa após seu retorno aos Estados Unidos (Foy et al., 2011). Posteriormente, vários estudos detectaram o vírus infeccioso no sêmen de homens infectados (Barzon et al., 2016; Mansuy et al., 2016) e, também foram relatadas transmissões sexuais de ZIKV de mulher para homem (Davidson et al., 2016; Musso et al., 2015). Outro estudo detectou RNA viral no sêmen humano 38 dias após a primeira detecção (Medina *et al.*, 2019). A carga viral obtida no sêmen foi superior a observada em outros materiais biológicos, como urina ou sangue (Atkinson *et al.*, 2016; Mansuy *et al.*, 2016). Em outro caso de transmissão entre humanos, ZIKV foi adquirido de um paciente hospitalizado por uma rota não-sexual desconhecida através do contato presumido com outros fluidos corporais infectados (por exemplo, lágrimas ou saliva), que continham vírus infeccioso (Miner et al., 2016b). Além disso, também é descrita a transmissão do ZIKV por transfusão de sangue e plaquetas (Barjas-Castro et al., 2016; Motta et al., 2016).

A via de transmissão vertical favorece a passagem de um agente causador de doença da mãe para o feto intraútero ou após o nascimento. Este tipo de transmissão pode ocorrer através da placenta, leite materno ou durante o parto. Em mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gravidez, a viremia materna pode levar à viremia fetal. No entanto, não é completamente compreendido como ZIKV é transmitido verticalmente para o sistema nervoso do feto em desenvolvimento, seguido do estabelecimento da viremia (Chen & Tang, 2016). Estudo realizado em duas mães e seus recém-nascidos oriundos da Polinésia Francesa em 2013, tiveram confirmação molecular para ZIKV por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) (Besnard et al., 2014). Estudos apontam que uma vez na circulação sanguínea, o ZIKV poderia infectar os monócitos fetais que carregariam o vírus para o sistema nervoso em desenvolvimento. Estudos em tecidos cerebrais de fetos nascidos de mãe infectadas pelo ZIKV demonstraram a presença de partículas virais, indicando que o vírus pode se replicar nas células do cérebro em desenvolvimento (Mlakar et al., 2016).

A capacidade exclusiva do ZIKV de se espalhar entre humanos por rotas não vetoriais, em relação a outros flavivírus, pode refletir sua possível

estabilidade aprimorada em fluidos corporais ou seu amplo tropismo de células e tecidos. Mais estudos são necessários para definir como a estabilidade relativa do ZIKV em vários fluidos corporais afeta sua transmissão.

1.4 Manifestações clínicas

1.4.1 Dengue

A dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas. A maioria dos pacientes permanece assintomática ou se recupera após um curso-clínico autolimitado brando, febril, acompanhado de alterações hematológicas e bioquímicas leves a moderadas (Srikiatkachorn et al., 2011). Uma pequena proporção desses pacientes desenvolve complicações clinicamente relevantes, incluindo extravasamento vascular, anormalidades da coagulação que podem estar associadas ao sangramento e envolvimento de órgãos, geralmente hepáticos ou neurológicos (OMS, Diretrizes para Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle, 2009).

Embora as complicações graves não sejam frequentes e facilmente identificáveis, o espectro das manifestações clínicas da dengue é amplo e pode ser bastante sutil. O sistema de classificação original preconizado pela OMS em 1997 separava a dengue em dois pólos clinicamente distintos, a dengue e a febre hemorrágica da dengue (FHD) (OMS, 1997). Ainda, a FHD foi classificada em quatro graus de gravidade, sendo os graus III e IV definidos como Síndrome do Choque do Dengue (SCD). A utilidade desse sistema era muito questionada, principalmente em pacientes da América latina. Após um estudo multicêntrico, a OMS estabeleceu uma nova classificação da dengue em 2009 (Alexander et al., 2011). A classificação abrange indivíduos sintomáticos sem complicações ou com complicações graves em qualquer uma das três categorias, (1) extravasamento plasmático grave e suficiente para causar a síndrome do choque da dengue ou dificuldade respiratória; (2) sangramento grave; ou (3) comprometimento grave dos órgãos (OMS, 2009). A classificação está descrita na figura 1.3. Esse novo modelo de classificação é mais dinâmico, e tem como objetivo facilitar a triagem do paciente, tornar o manejo clínico mais eficaz e melhorar a qualidade dos dados epidemiológicos coletados globalmente, porém, ainda permanece controverso (Alexander et al., 2011).

Na dengue, após um período de incubação de 2-7 dias (máximo de 14 dias), os sintomas geralmente começam abruptamente e seguem três fases, as fases febril, crítica e de recuperação. Classicamente, a fase febril começa com o início repentino de febre alta e calafrios, geralmente com mal-estar, vômito, dor no corpo, mialgia, artralgia e dor de cabeça. O rubor da face e do tronco pode se tornar aparente entre os dias 2 e 3, e alguns pacientes apresentam erupção macular transitória (Rigau-Perez et al., 1998). Alguns pacientes podem apresentar dor de garganta, faringite e irritação conjuntival. Anorexia, náusea e vômito são comuns, o que pode dificultar o diagnóstico clínico diferencial. Essas manifestações clínicas não distinguem a evolução clínica, portanto, o monitoramento dos sinais de alarme e outros parâmetros clínicos são cruciais para o reconhecimento da fase crítica.

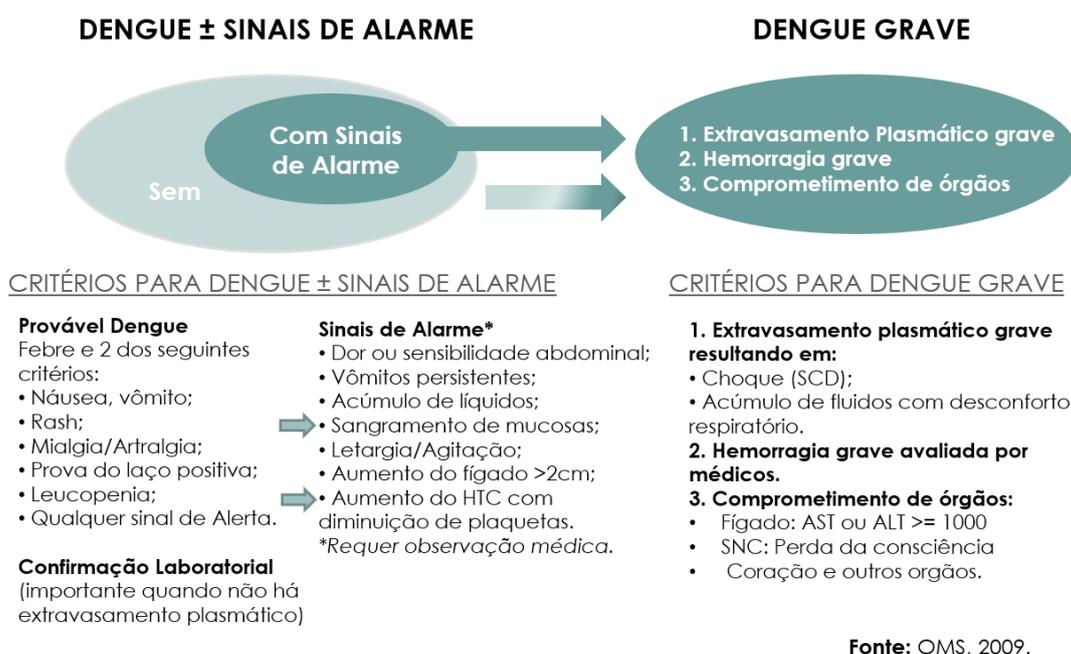


Figura 1.3. Classificação dos casos de dengue e seus níveis de gravidade. De acordo com a Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2009, a dengue é classificada em: Dengue com/sem sinais de Alarme e Dengue Grave. **Fonte:** Adaptado de *Dengue: Guideline for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, WHO, 2009.

A maioria dos pacientes melhora no período febril. No entanto, várias complicações podem se desenvolver na fase de defervescência, exigindo identificação imediata para facilitar o gerenciamento eficaz dos casos. Isso marca o início da *fase crítica*. O mais notável é uma vasculopatia mal definida, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e diminuição do volume intravascular, que pode progredir para a

síndrome de choque da dengue com risco de vida (Lam et al., 2013; Rosenberger et al., 2016). Convencionalmente, 20% ou mais de hemoconcentração é aceito como evidência de extravasamento plasmático associado a dengue (OMS, 2009), mas esse critério é difícil de aplicar, uma vez que o hematócrito inicial é raramente conhecido (Lam et al., 2013). Manifestações hemorrágicas também são frequentes na fase crítica. Evidências clínicas de comprometimento de órgãos são observadas com menor frequência (Pang et al., 2017). Hepatomegalia assintomática e aumento leve a moderado das transaminases são comuns. O envolvimento neurológico é incomum, embora alguns casos sejam bem documentados.

Mesmo entre aqueles que desenvolvem complicações, com bons cuidados de suporte, a recuperação total é comum em uma a duas semanas. A permeabilidade vascular aumentada e a hemostase anormal são transitórias e resolvem-se dentro de 48 a 72 horas, mas o indivíduo geralmente permanece cansado e letárgico por vários dias. Em alguns casos, uma erupção cutânea convalescente pode persistir por várias semanas. A fase de recuperação pode ser bastante prolongada em adultos, que podem sentir profundo cansaço, fraqueza, mialgia e depressão por semanas a meses, após a resolução da doença aguda (revisado por Wilder-Smith et al., 2019).

Os pacientes com dengue grave podem apresentar alterações da coagulação, mas geralmente não são suficientes para causar hemorragias. Quando a hemorragia grave ocorre, quase sempre é associada com choque hipovolêmico profundo combinado com trombocitopenia, hipóxia e acidose, podendo levar à falência múltipla de órgãos e coagulação intravascular disseminada. Hemorragia maciça pode ocorrer, sem choque prolongado, em casos em que o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno ou corticosteróides tenham sido administrados (OMS, 2009). A maioria das mortes por dengue ocorrem em pacientes com choque profundo, especialmente se a situação é complicada pela sobrecarga de líquidos (OMS, 2009).

Em áreas hiperendêmicas, a dengue é em geral uma doença de crianças mais velhas e adultos jovens. Contudo, o risco de doença sintomática ou grave também é alto entre os bebês que nascem de mães imunes à dengue e são expostos à DENV pela primeira vez no momento em que os anticorpos anti-

dengue maternos (adquiridos por via transplacentária) estão diminuindo a títulos sub-neutralizantes (Kliks et al., 1988; Simmons et al., 2007; Chau et al., 2009). As mulheres grávidas são outro grupo de alto risco para doenças graves, especialmente durante o 3º trimestre, sendo reconhecida a transmissão perinatal para o feto (Basurko et al., 2018). Dois grandes estudos epidemiológicos no Brasil indicam que os sintomas da dengue durante a gravidez estão associados a um risco aumentado de nascimento prematuro e morte fetal, embora sem associação com malformações congênitas ou baixo peso ao nascer (Paixao, et al., 2017).

Em regiões com endemicidade relativamente baixa, a doença clínica é relatada com maior frequência em adultos do que em crianças, inclusive em pessoas acima de 60 anos. As comorbidades nesses adultos podem refletir uma maior probabilidade de complicações clínicas (Rowe et al., 2014).

1.4.2 Zika

Historicamente, a síndrome clínica causada pelo ZIKV em seres humanos é leve, consistindo em uma doença febril autolimitada semelhante à gripe que desaparece em poucos dias e é sintomática em cerca de 20% dos indivíduos infectados (Duffy et al., 2009; Simpson, 1964; Geser et al., 1970; Fagbami et al., 1979).

O período de incubação do ZIKV fica entre 3 a 12 dias (Ioos *et al.*, 2014; Rudolph *et al.*, 2014). Os sinais e sintomas mais frequentemente observados são conjuntivite, erupção cutânea, dor de garganta, febre, artralgia, mialgia e cefaléia. Sintomas menos frequentes incluem dor abdominal, constipação, diarreia, tontura, aftas, fotofobia, náusea, vômito, anorexia e dor retroorbital (Xavier et al., 2017).

No estágio inicial da doença, o paciente relata febre de até 38,5° C, que desaparece um a dois dias após o início da erupção cutânea e cefaléia. É frequentemente observado exantema maculopapular, que consiste em pequenas e múltiplas pápulas que podem se unir e formar grandes manchas vermelhas que são frequentemente pruriginosas, localizadas no pescoço, tronco e membros, palma das mãos e sola dos pés (Xavier et al., 2017). Há melhora da

erupção cutânea após dois a três dias, podendo persistir por duas semanas (Fagbami et al., 1977).

Muitas vezes, os pacientes apresentam conjuntivite que se manifesta como hiperemia e edema sem secreção purulenta. Os pacientes apresentam, ainda, dor nas articulações, mialgia e discreta lombalgia. As articulações mais afetadas são as mãos, joelhos e tornozelos. A duração dos sintomas articulares é de cerca de três a cinco dias (Xavier et al., 2017). A apresentação clínica da febre da zika é inespecífica e pode ser confundida com outras doenças febris, principalmente dengue e chikungunya (Zanluca et al., 2015). Em alguns grupos, a zika apresenta certas peculiaridades. Nas crianças, o quadro cutâneo pode ser atípico, caracterizado por lesões maculares com tendência à confluência e lesões vesiculares (Zanluca et al., 2015).

Raramente, porém muito impactante, a zika tem sido relacionada às complicações neurológicas, como a Síndrome Congênita do ZIKA, síndrome de Guillain-Barré, mielite e meningoencefalite (Song et al., 2017). Em uma série de casos de gestantes sintomáticas infectadas pelo ZIKV no Brasil, 29% dos fetos exibiram algum tipo de anormalidade nos exames de ultrassonografia (Brasil et al., 2016a; Brasil et al., 2016b).

A síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV (SCZ) compreende um conjunto de sinais e sintomas apresentados por crianças nascidas de mães infectadas por esse vírus durante a gestação. A microcefalia é a manifestação mais marcante dessa síndrome, que pode ter um amplo espectro de características clínicas, variando de leve a grave. A microcefalia é uma condição na qual o perímetro cefálico occipito-frontal (OFC) é acima de dois desvios padrão abaixo da média comparado aos bebês da mesma idade gestacional, peso e sexo (Song et al., 2017; Chen & Tang, 2016).

De acordo com o CDC, a microcefalia é uma alteração neurológica rara, afetando dois bebês a cada 10 mil nascimentos, e avaliação retrospectiva da epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa encontrou um risco aumentado de microcefalia associada à infecção, com 95 casos por 10.000 mulheres infectadas no 1º trimestre (Cauchemez et al., 2016; Del Campo et al., 2017). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética do cérebro de recém-nascidos com infecção congênita no Brasil demonstraram hipoplasia do cerebelo e tronco

cerebral, ventriculomegalia, mielinização tardia, cisterna magna aumentada, anormalidades do corpo caloso, calcificações e malformações corticais (de Fatima, et al., 2016). A infecção congênita por ZIKV também pode resultar em perda auditiva neurossensorial e deficiências visuais em humanos com uma variedade de anormalidades oculares (de Paula, et al., 2016; França, et al., 2018).

Ainda não se conhecem completamente o espectro e as consequências da SCZ para a saúde das crianças acometidas, embora seja notável a gravidade dos casos com evidência de prejuízos ao crescimento e desenvolvimento infantil (Moore, et al., 2017).

Estudo desenvolvido pelo CDC detectou a presença do vírus por RT PCR e imunohistoquímica no tecido cerebral de quatro recém-nascidos com microcefalia e/ou com malformações graves cerebrais que evoluíram para o óbito após o nascimento e nas placentas de fetos abortados na 12^a semana de gestação (Martines, et al., 2015). Achados similares foram identificados por Mlakar e colaboradores (2016) que identificaram o genoma viral na placenta e no cérebro de um feto abortado na 32^a semana de gestação que apresentou múltiplas lesões cerebrais e retardo de crescimento intrauterino a partir da 29^a semana, o que confirma o neurotropismo do vírus com possível persistência viral no tecido cerebral e grave comprometimento placentário.

A patogênese da microcefalia pós-natal pelo ZIKV ainda não está bem descrita. A diminuição no perímetro encefálico e no desenvolvimento cerebral podem ser consequência da destruição de neuroprogenitores, neurônios e a presença persistente de moléculas associadas com respostas inflamatórias *in utero* (van der Linden, et al., 2016). As vias de sinalização inflamatórias presentes nas células progenitoras neuronais são cruciais para uma resposta imunológica eficiente. Estas vias podem ser ativadas pelo ZIKV, resultando em diminuição da regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose (Musso, et al., 2015; Chen & Tang, 2016; van der Linden, et al., 2016).

Além disso, o ZIKV parece induzir ou imitar a autoimunidade em um número limitado de casos por mecanismos desconhecidos (Oehler, et al., 2014; Zea-Vera & Parra, 2016). Durante a epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa, foram descritos relatos de casos da síndrome de Guillain-Barré (SGB) associada ao

ZIKV, caracterizada por paralisia ascendente e polineuropatia (Oehler, et al., 2014). Também foi relatada uma associação da infecção pelo ZIKV com a SGB no Brasil, Colômbia e outros países (do Rosário et al., 2016). Esta síndrome é observada alguns dias após a infecção por vírus, parasitas ou bactérias. Se esta condição não for tratada de maneira adequada, o paciente pode sofrer complicações graves, como embolia pulmonar, parada cardíaca e paralisia da musculatura respiratória (Parik et al., 2012). A SGB pode ocorrer concomitantemente à infecção aguda pelo ZIKV ou imediatamente após (do Rosário et al., 2016; Siu et al., 2016), sugerindo que a desmielinização dos nervos periféricos se deve a infecção direta e/ou autoimune. Estudos eletrofisiológicos demonstraram neuropatia axonal aguda e análises laboratoriais revelaram a presença de autoanticorpos (por exemplo, anticorpos anti-glicolipídicos e anti-GA1), embora os anticorpos anti-gangliosídeos típicos associados à SGB fossem detectados apenas raramente nesses pacientes (Cao-Lormeau et al., 2016).

1.4.3 Sintomatologia na coinfeção Dengue/Zika

Infecções humanas pelo DENV ou ZIKV são predominantemente assintomáticas e, quando sintomáticas, os sinais e sintomas clínicos mais frequentes são cefaléia, febre baixa, mialgia, artralgia e fadiga (Al-Afaleg, 2017). Também é observado exantema com início maculopapular e pruriginoso, que se espalha para as extremidades (Simpson, 1964). Como descrito anteriormente, nossa equipe avaliou 134 pacientes suspeitos de infecção por arbovírus na fase aguda. Enquanto prostração e vômito estavam associados significativamente à monoinfecção por DENV, prurido e edema foram mais associados à monoinfecção por ZIKV. Os pacientes coinfectados com DENV/ZIKV apresentaram menor frequência de exantema e prurido e significativamente menos dor de cabeça do que pacientes com monoinfecção por DENV (Azeredo et al., 2018).

1.5 Defesa imunológica contra as infecções por DENV e ZIKV em humanos

Humanos podem adquirir dengue sintomática mais de uma vez na vida, devido à circulação de quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus.

Enquanto a infecção primária por qualquer um dos quatro sorotipos confere imunidade por toda a vida ao sorotipo infectante (homólogo) (Sabin, 1952), estudos epidemiológicos indicam que as formas graves da dengue, FHD/SCD, podem ocorrer em indivíduos acometidos por uma segunda infecção por um sorotipo diferente (heterólogo) (Halstead, 2007). A imunidade também pode ser de proteção-cruzada após exposição ao sorotipo heterólogo, mas, essa proteção se dá por apenas 2 a 3 meses após a infecção anterior (Sabin, 1952). Após a diminuição da proteção-cruzada, pacientes com infecções secundárias por um sorotipo heterólogo podem apresentar curso alterado da infecção. Ainda que controverso, já foi demonstrado que nesses casos, a viremia dos pacientes atinge um pico com níveis mais altos, aumentando o risco de desenvolver formas graves da doença (Vaughn, et al., 2000).

Duas hipóteses, o pecado antigênico original de linfócitos T e a facilitação da infecção dependente de anticorpo (*antibody-dependent enhancement, ADE*), tentam explicar a ocorrência de dengue grave em infecções secundárias. A avaliação dessas hipóteses é crucial, considerando a circulação dos quatro sorotipos de DENV, os recentes surtos de ZIKV (Fernandez & Diamond, 2017; Wen, et al., 2017) e o alto percentual de semelhança genética e similaridade estrutural compartilhado entre DENV e ZIKV (Wen & Shresta, 2019).

A infecção pelo DENV e ZIKV começa na pele humana, mas os vírus precisam chegar ao sangue e causar viremia para que novos hospedeiros vetoriais sejam infectados e assim, ocorra disseminação da infecção viral. A resposta imune é ativada inicialmente no local da picada do mosquito na pele, onde estão presentes várias células imunes sentinelas, como as células dendríticas (DC), células de Langerhans (LC), macrófagos e mastócitos (MC) (Garcia, et al., 2017). As DC e os macrófagos são células alvo da infecção, e a infecção pelo DENV ou ZIKV pode desencadear a ativação das respostas imunes inatas antivirais, através da ativação de receptores de reconhecimento de padrão nessas células (Nasirudeen, et al., 2011; Wang, et al., 2006). O sistema interferon, compreendendo interferons tipo I (IFN- α , β), interferon tipo II (IFN- γ) e interferons tipo III (IFN- λ 1-4), é o mecanismo principal pelo qual o sistema imunológico inato se defende contra infecções virais (Morrison & García-Sastre, 2014; Lai, et al., 2018; Diamond, et al., 2000). O sistema de IFN tipo I é

acionado poucas horas após a infecção viral, mediante o reconhecimento do vírus por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors, PRR*), como os receptores do tipo RLR (*retinoic acid–inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors*) e receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors, TLR*). O reconhecimento dos ácidos nucleicos virais por estes PRR resulta na ativação de múltiplos fatores de transcrição, incluindo fatores reguladores de interferon (IRF) e NF- κ B, que cooperam na indução dos IFN e várias outras citocinas e quimiocinas inflamatórias, orquestrando as respostas imunes inatas e adaptativas (Uno & Ross, 2018).

A atividade biológica dos IFN do tipo I é mediada pelo desencadeamento de seu próprio programa de transcrição, que resulta na expressão de centenas de genes estimulados por interferon (*interferon-stimulated genes, ISG*) (Schneider, et al., 2014). Esses ISG influenciam muitos processos celulares, incluindo processamento de RNA, estabilidade de proteínas e viabilidade celular, afetando diretamente etapas imprescindíveis na replicação viral. Nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e DC, os ISG também são importantes para a ativação de linfócitos T e B, afetando a magnitude e a qualidade da resposta imune adaptativa e a eliminação do vírus (Uno & Ross, 2018).

Para facilitar a replicação/disseminação viral e causar doenças em humanos, cada flavivírus patogênico desenvolveu vários mecanismos distintos no intuito de inibir as vias de transdução de sinal que induzem a produção de IFN tipo I e a expressão dos ISG. Na última década, foram revelados numerosos mecanismos pelos quais o DENV antagoniza as vias de transdução de sinal envolvidas no sistema de IFN tipo I (Suthar, et al., 2013). Múltiplas proteínas do DENV, incluindo NS2A, NS4A, NS4B, NS2B3 e o sfRNA (RNA subgenômico de flavivírus) têm como alvo etapas distintas da sinalização RIG-I/MDA5 para inibir a produção de IFN tipo I (Muñoz-Jordan, et al., 2003).

Em humanos, foi demonstrado que o ZIKV antagoniza a resposta dos IFNs tipo I, II e III, assim como de inúmeros genes estimulados por IFN (ISG), em parte através da proteína NS5, que promove degradação proteossomal do STAT2 (Grant, et al., 2016), fator de transcrição que é ativado pela sinalização do receptor do IFN tipo I, IFNAR 1, limitando a produção de citocinas e a

expressão do marcador de ativação em DC primárias humanas (Bowen, et al., 2017).

Identificar os mecanismos específicos pelos quais o DENV e o ZIKV ativam e evitam o sistema de IFN e outros componentes do sistema imunológico inato, incluindo o sistema complemento, as células T $\gamma\delta$ e vários tipos de células linfóides inatas, é essencial para entender a patogênese viral e para contribuir para o desenvolvimento de terapias e vacinas eficazes contra DENV e ZIKV (Ngono & Shresta, 2018).

1.5.1 Resposta Imunológica Celular Adaptativa

DENV e ZIKV são considerados vírus pantrópicos e, portanto, empregam estratégias de disseminação semelhante. No local de inoculação, os virions se replicam em monócitos, macrófagos e DC, que também são células aptas a “carregar” esses vírus para os linfonodos regionais levando à uma amplificação viral e aumento da viremia. As DC são críticas à apresentação de antígenos aos linfócitos T (Libraty, et al., 2001; Ho, et al., 2001) e, os IFNs tipo I e II atuam na promoção da ativação e aumento da capacidade de apresentação antigênica por estas células e, por consequência, no estabelecimento da imunidade adaptativa mediada pelos linfócitos T e B (Wakil, et al., 1998; Montoya, et al., 2002). De forma interessante, é possível encontrar linfócitos T CD8⁺ específicos do DENV na pele, visto que no sangue esses linfócitos T CD8 aumentam a expressão de receptores de quimiocinas, como CCR5, CXCR3 e CXCR6, bem como do antígeno associado a linfócitos cutâneos (*skin-homing molecule cutaneous lymphocyte-associated antigen*, CLA) durante infecção aguda (Rivino, et al., 2015)

Há vários estudos sobre o tropismo do ZIKV, mas questões de como o vírus atravessa epitélios intactos, como pode ser encontrado em determinados fluidos corporais e locais considerados imunoprivilegiados, ainda não se sabe claramente (Ngono & Shresta, 2018).

Em 2006, nosso grupo avaliou o *status* de ativação *ex vivo* dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes agudos naturalmente infectados por DENV (Azeredo et al., 2006). De forma bastante interessante, vimos que os linfócitos T CD8⁺ de pacientes coexpressavam fortemente o marcador de ativação HLA-DR,

-DQ, -DP e a proteína de grânulo citolítico Tia-1 comparado aos indivíduos saudáveis. Além disso, foi visto um aumento importante na frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando marcadores de células efetoras/memória CD44^{high}CD62L^{low}, além de moléculas de adesão/migração, como CD54 e CD11a. Ainda, vimos um aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando baixos níveis da molécula anti-apoptótica Bcl-2. Em conjunto, nossos dados indicaram que esse perfil de ativação de linfócitos T durante a fase aguda da dengue poderia estar contribuindo para a resposta imune anti-viral, inclusive nos tecidos alvos, uma vez que os linfócitos T efetores mostravam-se aptos a migrar (Azeredo et al., 2006).

As respostas imunes de linfócitos T antígeno-específicos são impulsionadas por dois fatores específicos do hospedeiro humano. Primeiro, a capacidade dos peptídeos derivados de antígenos serem ligados e apresentados no contexto das moléculas de HLA classe I e II. Segundo, a imunogenicidade desses peptídeos, que depende da capacidade dos linfócitos T de reconhecerem, através do receptor de linfócitos T (TCR), o complexo peptídeo-HLA. Como mostraremos a seguir, vários estudos identificaram epítomos do DENV que apresentam a capacidade de induzir resposta específica de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺, e conseqüentemente, a imunodominância de proteínas do DENV para resposta específica de linfócitos T. Uma compreensão abrangente sobre os epítomos imunodominantes, os parâmetros que influenciam essa imunodominância e imunogenicidade, além da capacidade de induzir imunidade específica ou de reatividade-cruzada são de extrema importância para propostas vacinais promissoras direcionadas para flavivírus (revisado por Tian et al., 2019).

Um dos primeiros grupos a descrever regiões específicas de cada sorotipo e aquelas altamente conservadas entre os 4 sorotipos de DENV foi realizado por Malavige e colaboradores (2002) utilizando a ferramenta de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e *custom perl scripts*. Como população de estudo, os autores utilizaram doadores saudáveis adultos imunes ao DENV, oriundos do Sri Lanka, nos quais foram identificadas 19 regiões dos 4 sorotipos de DENV que são sorotipo-específicas ou altamente conservadas. Seis peptídeos eram oriundos da região NS2A e 4 peptídeos da região NS4A. Todos

os doadores imunes responderam aos peptídeos de pelo menos dois sorotipos distintos.

De forma semelhante ao estudo anterior, Appanna e colaboradores (2007) também avaliaram as respostas de linfócitos T específicos frente a 32 peptídeos do DENV e ainda correlacionaram essas respostas à gravidade da doença, em um estudo que incluiu pacientes adultos da Malásia, alguns com FD e outros com FHD. O peptídeo NS3₍₄₂₂₋₄₃₁₎ foi considerado um alvo importante para os linfócitos T. Os picos mais altos de respostas dos linfócitos T foram dirigidos às regiões NS3₍₄₂₂₋₄₃₁₎ e NS5₍₅₆₃₋₅₇₁₎ em pacientes com FHD, indicando altas frequências de linfócitos T que reconheceram peptídeos específicos e de reatividade-cruzada nesses pacientes.

Estudo realizado por Hatch e colaboradores (2011) descreveu o perfil de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ DENV-específicos com a capacidade de produção de citocinas. Neste estudo, os autores avaliaram a frequência de resposta de linfócitos T específicos produtores de citocinas após a estimulação com antígenos dos 4 sorotipos do DENV. Os autores realizaram estudo retrospectivo utilizando PBMCs de crianças em idade escolar quando estavam saudáveis e as respostas foram comparadas entre as crianças que tiveram infecção secundária sintomática *versus* aquelas com infecção subclínica. As frequências mais altas de linfócitos T produtores de TNF- α , IFN- γ e IL-2 para os diferentes antígenos de DENV foi visto nas crianças que desenvolveram infecção subclínica em comparação àquelas que desenvolveram dengue sintomática.

Estudo realizado por Rivino e colaboradores (2013) forneceram uma visão abrangente da reatividade dos epítomos do DENV-2 mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes adultos com infecção secundária. Os autores demonstraram que existe uma diferença na imunodominância dos epítomos do DENV entre os linfócitos. Os epítomos dos linfócitos T CD8⁺ tem como alvo preferencial as proteínas não estruturais NS3 e NS5, enquanto os epítomos direcionados para os linfócitos T CD4⁺ são aqueles oriundos de partes das proteínas E, C e NS1, envolvidos com o reconhecimento dos componentes virais e que também são direcionados para a indução de resposta humoral. De forma interessante, os autores demonstraram ainda uma grande proporção de linfócitos T CD4⁺ epítomos-específicos com características fenotípicas de

linfócitos T auxiliares foliculares (CXCR5+ e produtoras de interleucina-21 ou IFN- γ , denominadas Tfh), que são caracterizadas pela sua capacidade de interação com os linfócitos B *in vivo*.

Ainda em 2013, Weiskopf e colaboradores confirmaram que os epítotos das proteínas NS3, NS4B e NS5, mas não a NS1 e E, eram as mais frequentemente reconhecidas e induziam de uma resposta robusta mediada por linfócitos T CD8⁺ em um grupo de doadores sadios imunes ao DENV oriundos do Sri Lanka. Uma maior variação na frequência e magnitude da resposta dos linfócitos T é em função dos diferentes alelos de HLA. Certos alelos foram associados à baixa frequência e magnitude de resposta das células T (como, A*01:01, A*24:02), enquanto outros à alta frequência e magnitude de resposta (como, B*07:02, B*35:01). Ainda, outros alelos foram associados à baixa frequência e alta magnitude (B*40:01) ou à alta frequência e baixa magnitude (A*26:01). No geral, as respostas restritas ao HLA-B foram de alta magnitude, sem aumento na frequência. Análise das citocinas produzidas pelos linfócitos T DENV-específicos revelou que respostas de alta magnitude estavam associadas às respostas multifuncionais pelos linfócitos T (Weiskopf et al., 2013).

Outro estudo foi realizado em doadores de sangue da Nicarágua nos quais foi observado um domínio de resposta restritas ao alelo de HLA B*35:01. As respostas ao IFN- γ foram associadas aos fenótipos de memória efetora, que também foram detectados em linfócitos T que não eram portadores do alelo B*35:01. Os linfócitos T DENV-específicos portadores do alelo B*35:01 foram associadas à expressão da proteína de morte programada-1 (*programmed death 1 protein, PD-1*) mas, ainda assim, proliferaram em resposta à estimulação específica ao DENV. Assim, além da expressão de alelos particulares de HLA classe I, existe um fenótipo distinto e altamente diferenciado, associado à magnitude e a frequência das respostas dominantes de linfócitos T CD8⁺ (de Alwis et al., 2016).

Ainda neste sentido, Townsley e colaboradores (2014) identificaram um epítoto altamente conservado, o epítoto NS1₍₂₆₋₃₄₎ reconhecido por linfócitos T CD8⁺ HLA-B*57-restritos, que são preferencialmente expandidos durante a infecção secundária, mas também são observados na infecção primária. Além disso, os autores observaram que o marcador CD71 era sensível à estimulação

dos peptídeos variantes, portanto, o CD71 foi considerado um fenótipo novo e distinto de linfócitos T epítopo-específicos que são ativadas diferencialmente.

Mais tarde, o mesmo grupo composto por Weiskopf e colaboradores (2015) descreveu subpopulações de linfócitos T CD4⁺ humanos específicos a determinados peptídeos do DENV, caracterizados por sua função efetora citotóxica em doadores que expressavam alelos de HLA associados com proteção a forma grave da dengue. Em seguida, os autores avançaram nos estudos de epítomos imunodominantes avaliando cada um dos 4 sorotipos do DENV. Eles demonstraram que os DENV-1, DENV-2 e DENV-4 induziam uma resposta de linfócitos T CD8⁺ direcionada predominantemente para as proteínas NS3, NS4b e NS5, mas que o DENV-3, unicamente, estimulava respostas de linfócitos T CD8⁺ cujos alvos eram as proteínas estruturais C, M e E.

Até o momento, o conjunto de dados da literatura apontam para a ideia de que respostas efetoras de linfócitos T DENV-específicos parecem estar associados com a doença clínica branda e a resolução de viremia, sugerindo um papel protetor dessas células na infecção aguda por dengue. Esse cenário foi demonstrado em estudo realizado por Wijeratne e colaboradores (2018), onde os autores observaram que as respostas de linfócitos T DENV-específicos foram maiores em pacientes com FD, quando comparadas àquelas com FHD. Além disso, os autores demonstraram que as respostas de linfócitos T específicos para o NS3 do DENV correlacionaram-se inversamente com o grau de viremia, e ainda, que as respostas dos linfócitos T específicos para as proteínas NS1, NS5 e pool de DENV correlacionou-se inversamente com o grau de trombocitopenia, mas não teve associação com transaminases hepáticas.

Além disso, Tian e colaboradores (2019) resumiram 14 estudos sobre epítomos derivados do DENV e extraídos da ferramenta Immunobrowser (<http://tools.iedb.org/immunomebrowser/>) (Dhanda, et al., 2018). Epítomos redundantes definidos independentemente em doadores com diferentes restrições de HLA foram incluídos para dar destaque aos peptídeos promíscuos capazes de serem apresentados e reconhecidos por diferentes moléculas de HLA. Os epítomos foram divididos com base na restrição de moléculas de MHC classe I ou classe II e plotados em uma sequência de referência do DENV (ID: 12637). A imunodominância dos linfócitos T CD8⁺ restritos aos HLA de classe I

visaram principalmente a proteína NS3, seguido pelas proteínas do C, NS5 e NS4A/B. A imunodominância do NS3 é confirmada ao longo de todos os diferentes estudos utilizados para análise, representando o alvo mais frequente da resposta dos linfócitos T CD8⁺, desconsiderando a região geográfica e a restrição de HLA. Por outro lado, as respostas de linfócitos T CD4⁺ têm como alvo principalmente a proteína C, seguido pelas proteínas E, NS3, NS2A/B e NS5. A imunodominância da proteína C é consistentemente identificada em todos os diferentes estudos analisados, representando o alvo mais frequente da resposta dos linfócitos T CD4⁺. No geral, a imunodominância das proteínas pelos linfócitos T é bastante complexa e focada em diferentes alvos proteicos, sugerindo que, para desencadear uma resposta de linfócitos T específica eficiente, as proteínas estruturais e não estruturais do DENV são requeridas (Tian et al., 2019).

Embora existam muitos estudos envolvendo modelos animais de infecção pelo ZIKV, há um número limitado de trabalhos que estudam as respostas imunológicas em humanos. Estudo realizado por Ricciardi e colaboradores (2017) analisou um indivíduo dengue naíve com infecção autóctone pelo ZIKV no surto de 2016 em Miami, Flórida. Neste paciente, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ reconheciam as regiões NS2A e E do ZIKV, respectivamente, através da produção de IFN- γ . Além disso, o estudo demonstrou o aparecimento da resposta de linfócitos T CD8⁺ específicos a partir do quinto dia, com um pico no 21º dia e se mantiveram em baixos níveis do 48º ao 140º dia. Dois outros estudos observaram que a resposta dos linfócitos T CD4⁺ específicos eram direcionadas para as regiões NS1, NS3 e NS5 e, as respostas de linfócitos T CD8⁺ para as regiões E, NS3 e NS5 (Edupuganti et al., 2017; Waggoner et al., 2017).

Estudo realizado por El Sahly e colaboradores (2018) utilizou 45 indivíduos dos Estados Unidos infectados pelo ZIKV e que foram acompanhados por até 12 meses. Em relação aos linfócitos T CD4⁺, os autores detectaram respostas para todas as proteínas do ZIKV, 89% dos pacientes foram considerados fortes respondedores aos peptídeos das proteínas E e C, mas a magnitude de resposta foi maior para as proteínas NS1, NS5 e NS3. Além disso, os autores observaram uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ após estímulo com peptídeos das proteínas NS3, NS5 e NS4B. Segundo os autores, as

respostas permaneceram detectáveis em alguns pacientes por até 12 meses. Os autores não observaram um efeito importante do envolvimento da exposição anterior ao DENV nas respostas dos linfócitos T, embora a magnitude de resposta de linfócitos T CD8⁺ contra as proteínas C, prM e NS1 tenha sido maior nos pacientes DENV-*naïve*.

Assim como nesse estudo, estudos longitudinais são muito bons para se avaliar a manutenção da imunidade ao longo do tempo. Sendo assim, Lai e colaboradores (2018) avaliaram 5 indivíduos viajantes, dentre eles duas grávidas, que retornaram aos EUA com infecção aguda sintomática pelo ZIKV e foram acompanhadas até 400 dias após a infecção. Segundo os autores, os linfócitos T CD4⁺ foram ativados moderadamente e produziram citocinas antivirais após estimulação com peptídeos da proteína C, prM, E e NS5 do ZIKV em todos os pacientes. Por outro lado, os linfócitos T CD8⁺ foram maciçamente ativados, mas os linfócitos T CD8⁺ funcionais e específicos contra os peptídeos das proteínas C, prM, E e NS5 do ZIKV eram geralmente ausentes ou de baixa frequência. Esse é o único estudo que levanta a possibilidade de uma imunidade dos linfócitos T CD8⁺ de menor duração na infecção pelo ZIKV.

Para examinar a natureza das respostas de linfócitos T CD8⁺ na infecção pelo ZIKV, Grifoni e colaboradores (2018) avaliaram as PBMCs de doadores infectados pelo ZIKV coletadas 1-2 anos após a infecção. As PBMCs foram inicialmente estimuladas com um *pool* de peptídeos do ZIKV e, em seguida, os linfócitos T CD8⁺ específicos produtores de IFN γ foram separadas para realização de uma análise transcriptômica. Os dados indicaram que esses linfócitos T CD8⁺ IFN γ ⁺ apresentaram assinaturas de expressão gênica associadas à polifuncionalidade, uma vez que apresentavam a capacidade de produzir diferentes citocinas, além de possuírem atividade citotóxica. Além disso, essa expressão gênica é reprodutível e temporalmente estável, independe da localização geográfica do paciente ou da exposição prévia ao DENV.

O papel dos linfócitos T CD4⁺, independente dos T CD8⁺, foi avaliado em um estudo realizado por Koblishke e colaboradores (2018). Neste estudo, os autores avaliaram 14 indivíduos austríacos que estiveram em áreas endêmicas de zika e que foram recrutados 10 semanas após a confirmação do diagnóstico. Os autores avaliaram a capacidade dos linfócitos T CD4⁺ de produzirem IL-2

quando estimuladas com *pools* de peptídeos das proteínas C, prM e E do ZIKV após a depleção de linfócitos T CD8⁺. Os linfócitos T CD4⁺ específicos para proteínas C e E foram detectáveis em 100% dos pacientes e para prM em 36%. Os epítomos imunodominantes das proteínas C e E agruparam-se em locais estruturalmente conservados entre os flavivírus, mas com sequências altamente variáveis. Assim, os autores sugeriram um forte impacto das características estruturais da proteína E nas respostas imunodominantes de linfócitos T CD4⁺.

1.5.2 Resposta Celular de reatividade-cruzada e o fenômeno do Pecado antigênico original

Sabin (1955) demonstrou que a imunidade protetora duradoura ao DENV é sorotipo específica, uma vez que a reexposição ao mesmo sorotipo doze meses após uma exposição inicial, não resulta em doença. No entanto, uma reexposição com sorotipos distintos em diferentes intervalos de tempo, leva a um grau variável de proteção heterotípica. Uma reexposição após 3 meses da primeira infecção, resultou em proteção heterotípica completa (ausência de viremia e de sintomas); uma reexposição entre 3 e 12 meses não conferiu proteção heterotípica completa, mas foi associada a dengue branda; enquanto em uma reexposição após 12 meses interferiu no curso da doença (Sabin, 1955).

Diferentes estudos prospectivos de coorte que exploram o histórico natural de infecções sequenciais pelo DENV, apóiam efeitos protetores e patogênicos variáveis da imunidade cruzada entre sorotipos do DENV. Neste contexto, estudo realizado por Anderson e colaboradores (2014) mostrou que um curto intervalo de tempo de 18 meses entre a infecção primária e secundária pelo DENV de crianças tailandesas estava associado a uma maior probabilidade de uma segunda infecção assintomática; a febre do Dengue após um intervalo de tempo médio de 21 meses; e dengue grave (febre hemorrágica da dengue) após um intervalo de tempo médio de 30 meses. O tempo entre as infecções não foi um fator preditivo significativo da doença após as infecções terciárias e quaternárias, sugerindo que a imunidade após múltiplas infecções sequenciais pode conferir efeitos protetores ou sustentados, a longo prazo.

Esses dados também levantam a possibilidade de a imunidade homotípica não ser um requisito para a eficácia tetravalente. Esses dados foram

corroborados por pesquisadores da Nicarágua (Montoya, et al., 2013). Essas observações sugerem que anticorpos heterotípicos de uma infecção primária protegem ou atenuam a doença após uma infecção secundária, mas essa proteção diminui com o tempo. Além disso, os anticorpos heterotípicos conferem proteção cruzada de curto prazo (3 a 12 meses) (Anderson, et al., 2014), onde evidências também indicam que esses anticorpos podem estar associados à dengue grave após intervalos mais longos entre as infecções primária e secundária (Guzmán, et al., 2000). Isso, porque foi demonstrado que o título de anticorpos heterotípicos diminui ao longo do tempo e por isso, estaria relacionado à gravidade das infecções subsequentes (CDC - Cuba, 1981; Guzmán, et al. 2000; Guzmán et al., 2002).

Vários estudos epidemiológicos indicam que a FHD/SCD ocorre com mais frequência em indivíduos com uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo do DENV (Halstead, 2007. Guzman, et al., 2000). Por décadas, as duas hipóteses do pecado antigênico original dos linfócitos T e a ADE não explicavam, mutuamente ou exclusivamente, porque apenas uma parte das infecções secundárias resultavam em dengue grave. A avaliação dessas hipóteses é cada vez mais crucial, agora, não apenas em relação aos 4 sorotipos de DENV, mas também pelo ZIKV. Ainda é controverso, mas evidências indicam que o DENV e o ZIKV induzam reatividade-cruzada tanto a nível humoral, como celular (Stettler et al., 2016; Grifone et al., 2017).

Um dos primeiros estudos que buscou entender o efeito das respostas dos linfócitos T preexistentes ao DENV na gravidade da infecção secundária pelo vírus foi realizado pelo Mangada e colaboradores (2002). Esse estudo foi realizado com crianças tailandesas em idade escolar, com infecção secundária pelo DENV-3, algumas hospitalizadas e com diagnóstico de FHD. No geral, os autores encontraram respostas reativas tanto aos antígenos do sorotipo homólogo como também, aos antígenos do sorotipo de reatividade-cruzada em relação à proliferação e produção de IFN γ e TNF α . Não viram diferenças significativas entre os grupos hospitalizados ou não, mas observaram uma tendência para as respostas de reatividade-cruzada com produção de TNF γ em indivíduos não hospitalizados.

Em 2003, Mongkolsapaya e colaboradores realizaram um estudo que levou a demonstração do fenômeno do pecado antigênico original dos linfócitos T. Particularmente relevante, os autores demonstraram que na infecção secundária por DENV-1, muitos linfócitos T foram marcados pelos tetrâmeros direcionados ao DENV-3. Já na infecção secundária por DENV-2, muitos linfócitos T reagiram aos tetrâmeros do DENV-1 e DENV-3. A resposta mensurável ao tetrâmero foi baixa na fase aguda e aumentou nas fases posteriores, confirmando o potencial de proliferação dessas células após estímulo pelo vírus infectante. Desta forma, um determinado sorotipo do DENV pode estimular a proliferação de um espectro de clones de memória com diferentes afinidades e de reatividade-cruzada. A descoberta de que a infecção secundária por um sorotipo que tem epítomos semelhantes, mas distintos, poderia então, estimular a proliferação de clones heterólogos, de baixa afinidade e de reatividade-cruzada, o que é consistente com o fenômeno do pecado antigênico original (Mongkolsapaya et al., 2003).

Mais tarde, diversos autores buscaram compreender como a resposta mediada por linfócitos T era modulada no contexto do pecado antigênico original. Para isso, examinaram a resposta dos linfócitos T aos peptídeos da proteína NS3, considerada a mais imunodominante para a resposta celular, do sorotipo do DENV prevalente na infecção nos pacientes com infecções primárias e secundárias apresentando febre do dengue (FD) e FHD. As PBMCs utilizadas para o estudo foram coletadas de crianças. Os autores constataram que tanto na FHD primária quanto na secundária, menos de 20% dos linfócitos T produziam CD107a (medida de capacidade de degranulação), enquanto >80% produzem apenas citocinas. Essa situação era invertida na FD primária, onde 71% produziam apenas CD107a e 29% de citocina, e a FD secundária, onde 45% produzi CD107a. A expressão de CD107a foi encontrada nos linfócitos T CD4⁺, além do CD8⁺, o que se encaixa nos relatos de citotoxicidade de linfócitos T CD4⁺ anti-dengue. Esse estudo ainda é muito importante para o entendimento da imunopatogênese da dengue, uma vez que os autores propuseram, pela primeira vez, que o potencial citotóxico limitado dos linfócitos T, em um subconjunto de pacientes, pode não estar associado a um controle viral precoce e eficaz. Além disso, os linfócitos T produtores de citocinas são estimulados, o

que no contexto da presença do vírus ou de antígenos virais, levará à produção excessiva de citocinas pró inflamatórias, podendo desencadear no dano tecidual e extravasamento vascular característicos da FHD/SCD (Duangchinda et al., 2010).

Por outro lado, a ideia de que as respostas dos linfócitos T de memória de reatividade-cruzada aparecem apenas nas infecções secundárias e de que essas células contribuem para a gravidade da dengue vêm sendo discutida. Neste contexto, Friberg e colaboradores (2011b) avaliaram linfócitos T CD8⁺ específicos para o epítomos NS3₁₃₃₋₁₄₂ de cada sorotipo do DENV restrito ao alelo HLA-A*11:01 em uma coorte de pacientes com infecção primária ou secundária e com doença branda ou grave. Os resultados mostraram que as respostas NS3₁₃₃-específicas não se correlacionaram com a exposição antigênica anterior ou a gravidade da doença nesta coorte.

Dung e colaboradores (2010) demonstraram que linfócitos T CD8⁺ específicos para NS3₁₃₃₋₁₄₂ geralmente não são mensuráveis no sangue periférico antes do início da hemoconcentração, trombocitopenia ou resolução da viremia e, portanto, parece improvável que sejam gatilhos críticos desses eventos.

Assim, é cada vez mais claro que a teoria do pecado antigênico original por si só não explica a associação entre reatividade-cruzada e gravidade da dengue. Estudo de Weiskopf e colaboradores (2013) dá indícios neste sentido. Autores utilizaram doadores de sangue saudáveis do Sri Lanka, país hiperendêmico de DENV. Análise detalhada dos linfócitos T CD8⁺ demonstrou que magnitude, frequência e amplitude das respostas dos linfócitos T CD8⁺ de memória desses pacientes foram ditadas pelos alelos de HLA que eles carregavam. Indivíduos portadores dos alelos HLA-B*35:01, B*07:02 e B*58:01 desenvolveram dengue branda e foram aqueles cujas respostas de linfócitos T eram de maior robustez e amplitude. Por outro lado, indivíduos portadores dos alelos HLA ditos susceptíveis, como os HLA-A*24:02 e A*01:01, foram àqueles que desenvolveram quadros graves (Weiskopf et al., 2013).

De acordo com esses achados, Simon-Lorière e colaboradores (2017) realizaram uma análise dos transcritos genéticos séricos e imunológicos de crianças cambojanas infectadas pelo DENV-1, na tentativa de entender o que

pode estar determinando as diferenças nas infecções clínicas sintomáticas das assintomáticas. Enquanto as vias inflamatórias e as vias de resposta imune inata foram semelhantes entre indivíduos assintomáticos e pacientes sintomáticos, a expressão de proteínas relacionadas à apresentação de antígenos e subsequentes vias de ativação de linfócitos T e B foi regulada diferencialmente, independente da carga viral e histórico prévio de infecção por DENV. Em conjunto, a infecção assintomática está associada ao aumento da ativação da imunidade adaptativa e aos mecanismos de controle adequados, levando à eliminação da infecção viral sem ativação imune excessiva.

Ainda na tentativa de entender o papel de linfócitos T na gravidade da dengue, Tian e colaboradores (2019) avaliaram linfócitos T CD4⁺ em indivíduos na fase aguda da infecção e observaram uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺ duplamente positivas (DP) para IL-10⁺IFN γ ⁺ nos pacientes com FHD quando comparados aos com FD. As assinaturas transcriptômicas do perfil transcriptômico destas células DP foram semelhantes nos grupos FD e FHD e se sobrepunham parcialmente aos dos linfócitos T CD4⁺ citotóxicos e reguladores tipo 1 (Tr1), embora a sua maioria não fosse nem citotóxica, nem Tr1, e incluía IL-21, IL-22, CD109 e CCR1. No geral, este estudo revelou um subconjunto de linfócitos T DP específicos para o DENV em pacientes com doença aguda e argumenta contra linfócitos T DP alterados como determinante para a FHD.

Nosso grupo (Badolato-Corrêa, et al., 2018) realizou um estudo transversal no qual comparamos a ativação dos linfócitos T na infecção aguda em indivíduos mono infectados pelo DENV ou ZIKV e co infectados por ambos os vírus. Um aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando os receptores de quimiocinas CCR5, CX3CR1 e CXCR3 foi visto nas infecções por DENV e ZIKV e na coinfeção por DENV/ZIKV, ou seja, independente da infecção, em relação aos controles saudáveis. No entanto, a coinfeção DENV/ZIKV diminuiu a capacidade dos linfócitos T CD4⁺ de produzir IFN- γ , TNF- α , TNF- α /IFN- γ e TNF/IL-2, em comparação com as mono infecções por DENV ou ZIKV. Desta forma, enfatizamos o potencial impacto da coinfeção na resposta imune de hospedeiros humanos, principalmente em áreas onde o DENV e o ZIKV cocirculam.

Até o presente momento, falávamos sobre a imunidade heteróloga dos linfócitos T considerando os 4 sorotipos de DENV. Com o novo cenário dos surtos de ZIKV no mundo, os autores quiseram compreender se a imunidade preexistente dos linfócitos T direcionadas ao epítomos do DENV modula as respostas mediadas por linfócitos T que respondem ao ZIKV. Desta forma, um estudo realizado por Grifoni e colaboradores (2017) demonstrou que as respostas de linfócitos T de memória induzidas por uma infecção prévia pelo DENV ou vacinação com vacinas tetravalentes atenuadas de dengue (*tetravalent dengue attenuated vaccines, TDLAV*), reconhecem peptídeos derivados do ZIKV. No entanto, as proteínas estruturais E, prM e C do ZIKV são os principais alvos das respostas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, diferente dos epítomos de linfócitos T do DENV que são encontrados principalmente em regiões não estruturais. Ainda, em pacientes imunes ao DENV e infectados pelo ZIKV, as respostas de linfócitos T ao ZIKV são detectadas mais cedo na fase aguda e em maior magnitude, mas diminui na fase convalescente. Por outro lado, em pacientes não-imunes ao DENV e infectados pelo ZIKV, a frequência de resposta de linfócitos T ao ZIKV continua a aumentar na fase convalescente, sugerindo um controle mais eficiente da replicação viral. A qualidade das respostas também é influenciada pela exposição prévia ao DENV. Os linfócitos T CD8⁺ ZIKV-específicos de pacientes imunes ao DENV e infectados pelo ZIKV aumentaram a expressão de granzima B e PD-1, diferentemente dos pacientes não-imunes ao DENV e infectados pelo ZIKV.

Além disso, um estudo realizado por Lim e colaboradores (2018) recrutou indivíduos imunes ao DENV e DENV-*naives*, todos sem exposição prévia ao ZIKV, para realizar seus estudos. Os autores demonstraram que indivíduos imunes ao DENV apresentaram reatividade cruzada de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, principalmente em relação aos epítomos da proteína NS3 do DENV e do ZIKV. Em relação as funções efetoras dessas células, indivíduos com imunidade prévia ao DENV exibiram linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória que podem exercer funções efetoras antivirais contra células infectadas por ZIKV *in vitro*, produzindo mediadores antivirais (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e granzima B). Particularmente, os linfócitos T CD8⁺ de reatividade cruzada exibem capacidade citolítica direta em células infectadas pelo ZIKV. Assim, em humanos, a imunidade pré-existente de

linfócitos T em relação ao DENV pode fornecer um papel imunoprotetor na infecção pelo ZIKV.

Nesta mesma temática, Delgado e colaboradores (2018) identificaram vários epítomos de linfócitos T ZIKV-específicos ou compartilhados entre DENV e ZIKV em doadores de sangue com histórico de infecção apenas por ZIKV ou infecção por DENV e ZIKV. Os autores confirmaram que as respostas de linfócitos T DENV-específicas são predominantemente direcionadas contra NS3, NS4B e NS5, mas, diferente do observado por Grifoni e colaboradores (2017), a resposta contra o ZIKV foi direcionada principalmente contra epítomos das proteínas NS1, NS3 e NS5. Considerando que uma maior porcentagem de identidade de sequências é observada entre as proteínas NS5 do ZIKV e DENV em comparação com a proteína NS1, levou os autores a postularem que a região NS5 contém mais peptídeos reconhecidos por linfócitos T de reatividade-cruzada, enquanto a proteína NS1 é preferencialmente direcionada para resposta de linfócitos T específicas para ZIKV.

Adicionalmente, Herrera e colaboradores (2018) demonstraram que, baseado nas respostas de linfócitos T produtores de IFN- γ e TNF- α oriundos de brasileiros, a região da protease da proteína NS3 do DENV e do ZIKV diferencia as infecções por DENV e ZIKV com sensibilidade de 94% e especificidade de 92%, enquanto indivíduos com infecções primária e secundárias por DENV têm padrões de resposta de linfócitos T semelhantes, com ampla reatividade cruzada para a região de helicase da proteína NS3 do ZIKV. Por fim, indivíduos com infecções primária por ZIKV e coinfeção primária por ZIKV/DENV têm alta reatividade cruzada à região da helicase da proteína NS3 do DENV. Análises semelhantes foram realizadas para avaliar respostas de linfócitos T humanos de pacientes africanos. Especificamente, os autores demonstraram que as respostas de linfócitos T à protease da proteína NS3 são específicas para ZIKV e DENV, mas as respostas direcionadas para a região de helicase da NS3 são de reatividade-cruzada.

1.5.3 Resposta Imune Humoral versus facilitação da Infecção dependente de Anticorpo

As glicoproteínas de superfície E e prM, assim como a proteína não estrutural NS1 foram identificadas como os principais alvos antigênicos para as respostas de linfócitos B humanos em infecções por DENV, enquanto que estudos que examinaram pacientes convalescentes demonstraram uma abundância de linfócitos B de memória prM e NS1-específicas (Beltramello, et al. 2010; Dejnirattisai, et al. 2010; Smith, et al. 2012; Friberg, et al., 2012). Além disso, estudos observaram que os anticorpos produzidos na fase aguda da dengue são amplamente direcionados à proteína E (Dejnirattisai, et al., 2015; Xu, et al., 2012; Priyamvada, et al., 2016). Dentre os anticorpos neutralizantes direcionados para a proteína E, o domínio DIII é um dos principais alvos em humanos, mas não o único, uma vez que foi demonstrado que o DENV-2 com o DIII modificado ainda são eficientemente neutralizados pelo soro humano (Wahala et al., 2012). Os epitopos localizados nos domínios DI e DII da proteína E parecem induzir uma fraca neutralização, mas uma forte resposta-cruzada (de Alwis et al., 2012). De forma interessante, um anticorpo pode ser tanto neutralizante como subneutralizante, dependendo de sua avidéz e concentração (Beltramello et al., 2010). É comumente aceito que anticorpos subneutralizantes de reatividade-cruzada participam efetivamente da gravidade da doença, enquanto os neutralizantes protegem contra a infecção (Dejnirattisai, et al., 2015; Xu, et al., 2012; Priyamvada, et al., 2016).

Em 1977, Halstead e O'Rourke foram pioneiros no conceito da ADE na dengue (Halstead & O'Rourke, 1977). Estudos demonstraram que a infecção de células expressando o receptor Fcγ (FcγR) na presença de anticorpos de doadores imunes a flavivírus pode aumentar significativamente a taxa de infecção. Assim, anticorpos de reatividade-cruzada presentes em concentrações sub-neutralizantes facilitam a captação de virions pelas células permissivas, aumentando a infecção. Ao invés de inibir a infecção viral, os imunocomplexos formados entre esses anticorpos e as partículas virais aderem às células e são internalizados de forma mais eficiente por meio do envolvimento de FcγR (Halstead, 2003). No caso de infecções por DENV, a ADE é uma das várias hipóteses propostas para explicar o aumento da gravidade da doença

associados às infecções heterotípicas repetidas (Kliks, et al., 1989; Vaughn, et al. 2000).

A ADE na infecção por DENV foi demonstrada por vários grupos utilizando soros e anticorpos monoclonais (mAbs) de pacientes com infecção primária e secundária e, onde foi demonstrado que mAbs neutralizantes e não-neutralizantes aumentam a infecção por DENV *in vitro* (Dejnirattisai, et al., 2015; Xu, et al., 2012; Priyamvada, et al., 2016). Desta forma, Dejnirattisai e colaboradores (2010) observaram que dentre os anticorpos monoclonais humanos específicos para todo o virion, 60% era direcionado contra a prM com alta reatividade-cruzada para todos os sorotipos, indicando uma capacidade de neutralização incompleta, mas um efeito consistente de ADE. Os autores propõem que a prM não é totalmente clivada durante a maturação da partícula viral e dependendo da quantidade de prM que permanece na superfície viral, anticorpos anti-prM podem levar tanto à ADE, como à neutralização. No entanto, parece que quando muita prM está presente, a resposta secundária de anticorpos não apresenta avidéz suficiente para a neutralização, induzindo ADE por virions imaturos. Alguns meses após este estudo, Beltramello e colaboradores (2010) observaram que todos os anticorpos contra as proteínas E e prM facilitaram a infecção quando em concentrações subneutralizantes. Anticorpos monoclonais anti-EDIII possuíram maior potencial de neutralização e foram tanto sorotipo específicos, quanto de reatividade-cruzada. Os anticorpos específicos para os domínios EDI/EDII e prM apresentaram menor capacidade de neutralização e maior de reação-cruzada.

Mais recentemente, alguns estudos demonstraram que a capacidade de ADE de anticorpos induzidos pelo DENV também pode se estender ao ZIKV (Priyamvada, et al. 2016; Dejnirattisai, et al., 2016). Esses estudos são importantes do ponto de vista epidemiológico, uma vez que a maioria das regiões que relataram casos de ZIKV também apresentam surtos de DENV. Além disso, a reatividade-cruzada entre os anticorpos do ZIKV e DENV pode não apenas criar problemas para o diagnóstico baseado em anticorpos (Cao-Lormeau, et al., 2014), mas também induzir ADE durante infecção pelo ZIKV, resultante de anticorpos não-neutralizantes do DENV. Foi relatado que os anticorpos anti-DENV interagem com o ZIKV, tanto produzindo efeitos protetores (devido à

neutralização cruzada) (Roth, et al. 2014; Oehler, et al. 2014) como ADE (devido aos anticorpos subneutralizantes) (Campos, et al., 2015; Cao-Lormeau, et al., 2016).

Recentemente, painéis de mAbs de pacientes infectados pelo ZIKV foram caracterizados para estudar as propriedades funcionais dos anticorpos específicos contra o ZIKV (Stettler, et al., 2016). Os anticorpos gerados a partir de linfócitos B de memória de pacientes com ZIKV incluíram mAbs específicos para ZIKV e de reatividade-cruzada para DENV. Interessante, mAbs anti-NS1 foram amplamente específicos para o ZIKV, apesar da alta reatividade cruzada exibida pelos soros dos mesmos doadores. Além disso, os mAbs que se ligavam ao EDIII, ou ao vírus inteiro, mas não à proteína E recombinante, eram altamente específicos para o ZIKV e neutralizavam o vírus *in vitro*. Em contraste, os mAbs presumivelmente específicos de EDI/EDII, evidentes por sua falta de ligação a EDIII, mas pelo reconhecimento da proteína E completa, apresentaram uma ligação de reatividade-cruzada ao DENV e neutralizaram pobremente o ZIKV (Stettler, et al., 2016).

Por outro lado, mAbs dos epítomos do dímero do envelope (envelope dimer epitope, EDE), neutralizaram de forma potente todos os 4 sorotipos de DENV (Dejnirattisai, et al. 2015), bem como o ZIKV (Dejnirattisai, et al., 2016; Barba-Spaeth, et al., 2016), além de melhorarem a infecção por ZIKV *in vitro* pelo ADE. No entanto, a incubação de concentrações neutralizantes de mAbs EDE-específicos com concentrações aumentadas de soro policlonal da dengue reduziu a infecção de células portadoras de FcγR. Em contraste, a presença de mAbs contra peptídeos do *loop* de fusão (fusion loop epitope, FLE), pouco neutralizantes, não anulou o aumento da infecção por anticorpos séricos (Dejnirattisai, et al., 2016). Esses dados sugerem que o potencial de neutralização de anticorpos direcionados para certos epítomos, como EDE, podem impedir o efeito da ADE, enfatizando as possíveis vantagens do desenho da vacina baseada em epítomos.

1.5.4 Memória Imunológica e produção de vacinas contra DENV e ZIKV baseada na resposta de linfócitos T

A descrição de diferentes subpopulações de linfócitos T de memória tem sido recorrente (revisado por Caccamo, et al., 2018). A primeira caracterização da heterogeneidade dessas células em um conjunto de linfócitos T CD8⁺ de memória de origem indefinida em humanos, descreveu duas subpopulações: a memória efetora CD62L^{low}/CCR7^{low} (T_{EM}) e a memória central CD62L^{high}/CCR7^{high} (T_{CM}). A expressão de CCR7 e CD62L nos linfócitos T_{CM} facilita seu retorno aos órgãos linfóides secundários, enquanto os linfócitos T_{EM} são mais citolíticas e expressam integrinas e receptores de quimiocinas necessários para a localização nos tecidos inflamados (Sallusto, 2016). A expressão de CD45RA é geralmente associada aos linfócitos T *naïves*, mas, uma subpopulação de linfócitos T_{EM} reexpressa CD45RA, denominadas T_{EMRA}, que aparecem após estimulação antigênica e suas características e funções moleculares vem sendo descritas (Patil, et al., 2018).

Um estudo realizado por Weiskopf e colaboradores (2015) demonstrou uma alta frequência de linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} DENV-específicos em doadores portadores do alelo HLA-DRB1*04:01 associado à proteção contra a dengue grave. Os linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} expressam várias moléculas citotóxicas, incluindo CD107a, perforina, granzima B, bem como o receptor CX3CR1 e participam ativamente do mecanismo citolítico. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ T_{EMRA} têm sido cada vez mais envolvidos na imunidade protetora contra o DENV, onde um estudo realizado por Tian e colaboradores (2017) mostrou que o fenótipo dos linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} são heterogêneos entre os indivíduos, com base na expressão do receptor acoplado à proteína G, GPR56. Os linfócitos T CD4⁺ GPR56⁺ T_{EMRA} exibem um programa transcricional e proteômico com características citotóxicas distintas dos linfócitos T_{EM}. Além disso, os linfócitos GPR56⁺ T_{EMRA} têm níveis mais altos de expansão clonal e a maioria, são específicos ao DENV. Nesta mesma linha, Patil e colaboradores (2018), baseado em relatos anteriores sobre o papel protetor dos linfócitos T CD4⁺ citotóxicos (CD4-CTLs) na dengue, avaliaram o perfil transcricional para desvendar a heterogeneidade das CD4-CTL e a sua clonalidade em humanos. A análise de expressão gênica diferencial revelou um espectro de transcritos, vários

vinculados à função citotóxica e co-estimulatória que são expressos em níveis mais altos, além de uma expansão clonal acentuada nas CD4-CTL T_{EMRA}, comparado aos linfócitos T CD4⁺ T_{CM} e T_{EM}.

Além disso, um estudo realizado por de Alwis e colaboradores (2016) demonstrou que a maioria dos linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN γ ⁺ específicos para epítomos do DENV são linfócitos T_{EM} (CD45RA⁻CCR7⁻) ou T_{EMRA} (CD45RA⁺CCR7⁻). Recentemente, Tian e colaboradores (2019b) analisaram os perfis transcriptômicos dos linfócitos T CD8⁺ T_{EM} e T_{EMRA} específicos para epítomos do DENV de doadores saudáveis com infecção secundária por DENV. Os autores demonstraram que mais genes são expressos em níveis mais altos nos linfócitos T_{EM} do que nos T_{EMRA}. Por outro lado, os T_{EMRA} têm maior expressão de receptores do tipo imunoglobulina de células NK (KIRs), sugerindo um fenótipo e função mais especializados. Por fim, ambos os linfócitos T CD8⁺ específicos T_{EM} e T_{EMRA} exibem uso preferencial de alguns repertórios CDR3 da cadeia β do TCR (TRB), indicando expansão clonal de apenas alguns clones de linfócitos T.

Em relação a memória imunológica na infecção pelo ZIKV, um estudo realizado por Ricciardi e colaboradores (2017) acompanhou longitudinalmente as respostas de linfócitos B e T de um indivíduo nunca exposto ao DENV. Os autores usaram o tetrâmero para rastrear a resposta ZIKV-específica dentre os linfócitos T CD8⁺. A análise fenotípica revelou que a maioria das células positivas para o tetrâmero era caracterizada por linfócitos T_{EM}. Outro estudo desenvolvido por Cimini e colaboradores (2017), analisou uma coorte maior de pacientes italianos infectados pelo ZIKV. Os autores analisaram o perfil de diferenciação dos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e as CD3⁺CD4⁻CD8⁻ ou duplo negativas (DN) pela expressão de CD45RA e CD27, permitindo discriminar linfócitos T *naïves* (CD45RA⁺CD27⁺), T_{CM} (CD45RA⁻CD27⁺), T_{EM} (CD45RA⁻CD27⁻) e T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻) em pacientes com infecção aguda por ZIKV ou DENV. A análise dos linfócitos T CD8⁺ não mostrou nenhuma diferença no perfil de diferenciação entre ZIKV, DENV e indivíduos saudáveis. Em contraste, pacientes com ZIKV mostraram uma frequência mais baixa de linfócitos T CD4⁺ e DN T_{CM}, mas um aumento de CD4⁺ e DN T_{EM} e T_{EMRA} em comparação com os pacientes DENV e controles. Além disso, uma expansão substancial de linfócitos T DN que

expressam o TCR V δ 2 foi especificamente observada em pacientes com ZIKV. Esses linfócitos V δ 2 T que apresentaram um perfil T_{EMRA}, expressam granzima B e eram produtores IFN γ .

Todos os achados discutidos anteriormente contribuem para um conhecimento mais profundo sobre a geração da imunidade e o perfil da resposta imune nas infecções por DENV e ZIKV. Por consequência, geram conhecimento à identificação de mecanismos imunopatogênicos das formas graves das doenças e à definição de novas estratégias terapêuticas e vacinais mais eficazes no controle das infecções.

Atualmente, não há vacina ou terapia antiviral aprovados para DENV ou ZIKV. Os candidatos terapêuticos específicos para a zika e, em particular, as vacinas, começaram a ser desenvolvidas rapidamente (Pierson & Graham, 2016; Barouch, et al., 2017). No entanto, DENV e ZIKV estão entre os flavivírus humanos patogênicos mais relacionados, com 55,1% a 56,3% de identidade de sequência de aminoácidos. Essa estreita relação antigênica à níveis de anticorpos e linfócitos T pode ser considerada como um fator desafiador para o desenvolvimento de vacinas para ambos os vírus, devido a possíveis papéis na proteção e patogênese dos anticorpos e linfócitos T de reatividade cruzada (revisado por Ngono & Shresta, 2018).

Os desafios específicos para medir a imunogenicidade e a eficácia da vacina contra dengue incluem semelhança antigênica dos 4 sorotipos do DENV, criando um alto grau de reatividade cruzada entre eles nos ensaios sorológicos (ELISA) e biológicos (teste de neutralização para redução de placa ou *plaque reduction neutralisation test*, PRNT) (Thomas, et al. 2009); e ausência de dados correlatos que definam proteção ou risco, baseado em estudos de infecção natural ou de ensaios de eficácia de vacinas (Wichmann, et al., 2017; Katzelnick & Harris, 2017).

O desenvolvimento da vacina contra o DENV concentrou-se em formulações tetravalentes que simultaneamente fornecem imunidade a todos os 4 sorotipos (Whitehead et al., 2007). Atualmente, 5 tipos de vacinas contra a dengue estão sob investigação, incluindo vacina viva atenuada, vacina inativada, vacina de subunidade recombinante, vacina de vetor viral e vacina de DNA (Deng et al., 2020).

Várias vacinas vivas atenuadas foram feitas baseadas na tecnologia de DNA recombinante, como a vacina viva atenuada quimérica contra o vírus febre amarela 17D e os 4 sorotipos de DENV (CYD-TDV, Live Attenuated Chimeric Yellow Fever–Dengue Vaccines), vacina viva atenuada contra o mutante DENV-4 recombinante portador de uma exclusão de 30 nucleotídeos (rDEN4 Δ 30, Live Attenuated rDEN Δ 30 Vaccines), e a vacina viva atenuada quimérica tetravalente contra os 2 sorotipos do DENV (DENVax, Live Attenuated Chimeric Tetra-Dengue Vaccine) (Lee, et al., 2002).

Estudos de imunogenicidade iniciais da CYD-TDV ou Dengvaxia®, vacina licenciada pela empresa Sanofi Pasteur, baseando-se na expressão das proteínas prM e E do DENV em um esqueleto do vírus da febre amarela (YF17D), mostraram soroconversão com o ensaio de PRNT para os 4 sorotipos (Leo, et al., 2012; Guirakhoo, et al., 2006). Os ensaios de fase III mostraram variações no desempenho de Dengvaxia® por faixa etária e sorotipo do DENV. A eficácia da vacina foi maior para DENV-3 (74%) e DENV-4 (83%) do que para DENV-1 (58%) e DENV-2 (47%), e a maior variância específica de sorotipo foi observada na subpopulação dos participantes do estudo que eram soronegativos para DENV antes da vacinação (Hadinegoro, et al., 2015). A eficácia combinada da vacina foi de 52,5% em crianças com idade mínima de 9 anos, soronegativos antes da vacinação, enquanto a eficácia foi muito menor (14,4%) para participantes menores de 9 anos soronegativos. A eficácia da vacina na prevenção de internação em crianças com mais de 9 anos foi de 80,0%, enquanto em crianças com menos de 9 anos, a eficácia contra a doença grave foi de 56,1% (Hadinegoro, et al., 2015). É provável que a Dengvaxia® atue como uma vacina monovalente ou bivalente que gera respostas imunológicas homotípicas e protetoras apenas ao DENV-3 e 4. Desta forma, é provável que os anticorpos neutralizantes medidos para os DENV-1 e 2 sejam heterotípicos (Capeding, et al., 2014; Villar, et al., 2015).

Ensaio clínico independente de fase I foram conduzidos na Austrália e nos EUA para avaliar a segurança e imunogenicidade dos candidatos à vacina da Sanofi Pasteur contra a dengue. Nesse contexto, um estudo realizado por Guy e colaboradores (2008) avaliaram as respostas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para DENV1-4 e 17D-204 (YF17D) induzidas pela vacina

Dengvaxia® em pacientes imunes ou flavivírus-*naïves*. Os estudos demonstraram que a Dengvaxia® induziu uma forte resposta de linfócitos T CD8⁺ NS3-específicos para o YFV em indivíduos DENV-*naïves*, mas uma fraca resposta de linfócitos T CD8⁺ NS3-específicas para o DENV em indivíduos imunes ao DENV, indicando uma ausência de reatividade cruzada entre as respostas de linfócitos T CD8⁺ específicos para YF 17D ou para a NS3 do DENV.

Estudo realizado por Harenberg e colaboradores (2013) caracterizou a imunidade celular induzida pela vacina Dengvaxia®. As respostas linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ específicos para NS3 do DENV foram detectadas antes da vacinação. A vacinação induziu respostas de linfócitos T CD8⁺ IFN γ ⁺ específicos para NS3 YF-17D, sem produção significativa de TNF α , e uma resposta celular Th1/Tc1 específica para Dengvaxia® em todos os participantes, caracterizada por secreção predominante de IFN- γ em comparação com TNF- α e associada a níveis baixos de IL-13. Esses achados confirmaram as observações anteriores sobre a natureza e a especificidade das respostas celulares induzidas pelo Dengvaxia®V e, pela primeira vez, demonstram a persistência das respostas celulares após um ano.

A vacina de DENV vivo atenuada (*live attenuated DENV vaccine, DLAV*), desenvolvida pela U.S. National Institutes of Health. A (TV003) é uma mistura de quatro candidatos a vacina recombinante atenuada contra a dengue, incluindo rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31 e rDEN4 Δ 30, que está em fase I de teste clínico. Verificou-se que, após a vacinação com a TV003, foram detectados anticorpos dos 4 sorotipos de DENV em 91,7% dos indivíduos e que a potência protetora contra o DENV-2 era superior à da vacinação com Dengvaxia®, com a única reação adversa apresentando uma erupção cutânea leve.

Uma nova formulação tetravalente (TV005) com maior dose do vírus quimérico para o DENV-2 foi avaliada em ensaio clínico nos Estados Unidos (revisado por Deng, et al., 2020). Um ensaio clínico de fase I mostrou que uma única vacinação com a TV005 induziu uma resposta imune relativamente equilibrada em 90% dos vacinados, enquanto a vacinação do TV003 causou apenas uma resposta imune em 76% dos receptores (Kirkpatrick, et al., 2015).

Além disso, Weiskopf e colaboradores (2015) caracterizaram pela primeira vez as respostas de linfócitos T CD8⁺ após vacinação com DLAV. Os

autores coletaram sangue dos participantes de uma unidade do estudo que receberam a DLAV monovalente ou tetravalente. Após a vacinação, as respostas dos linfócitos T CD8⁺ a um conjunto de peptídeos do DENV restritos aos MHC de classe I nos vacinados eram facilmente detectáveis e comparáveis à infecção natural. Curiosamente, as respostas de linfócitos T CD8⁺ às proteínas estruturais e não estruturais foram observadas após a DLAV monovalente, enquanto após as DLAV tetravalentes foram dramaticamente focadas nas proteínas não estruturais altamente conservadas, capazes de provocar respostas multifuncionais de linfócitos T.

Mais tarde, o mesmo grupo avaliou a respostas de linfócitos T CD4⁺ de doadores vacinados com DLAV tetravalente com estimulação das PBMCs com um conjunto de peptídeos do DENV restritos ao MHC de classe II. As respostas dos linfócitos T CD4⁺ DENV-específicos foram concentradas predominantemente aos antígenos das proteínas C, NS3 e NS5. De forma semelhante aos linfócitos T CD8⁺, as respostas de linfócitos T CD4⁺ nos vacinados foram semelhantes em magnitude e amplitude àquelas após a infecção natural e reconheceram a mesma hierarquia de antígenos (Angelo, et al., 2017).

Os RNAs recombinantes de uma cepa de DENV-2 atenuada (TDV-2) e três vírus quiméricos contendo os genes prM e E do DENV-1, 3 e 4 expressos no contexto do genoma do DENV-2 (TDV-1, TDV-3, TDV-4, respectivamente) (Kinney, et al., 1997; Butrapet, et al., 2000; Huang, et al., 2000; Huang, et al., 2003; Osorio et al., 2011) foram usados para transfectar células Vero para produzir uma vacina candidata chamada DENVax (Brewoo, et al., 2012). A DENVax, foi extensivamente testada em estudos pré-clínicos, 2 ensaios clínicos de Fase I concluídos e atualmente está sendo testado em ensaios clínicos de Fase II. Nos estudos da Fase I com voluntários adultos saudáveis, a vacina candidata demonstrou ser geralmente bem tolerada e induziu respostas de anticorpos neutralizantes aos 4 sorotipos de dengue (revisado por Prompetchara et al., 2019). Um estudo realizado por Chu e colaboradores (2015) caracterizaram a resposta de linfócitos T CD8⁺ em voluntários humanos que nunca tiveram contato com flavivírus, vacinados com 2 doses de DENVax com 90 dias de intervalo por via subcutânea ou intradérmica. As respostas de

linfócitos T CD8⁺ foram mais altas no 90° dia após a 1° dose e ainda eram detectáveis nos 180° dias após a 2° dose. Além disso, apresentaram linfócitos T CD8⁺ multifuncionais, produzindo duas ou mais citocinas simultaneamente e reativos as proteínas NS dos outros 3 sorotipos do DENV.

Em resumo, a vacina viva atenuada CYD-TDV tem uma proteção definitiva em indivíduos soropositivos para o DENV acima de 9 anos de idade. A vacina rDENΔ30 induz uma resposta imunológica protetora mais equilibrada entre os 4 sorotipos de DENV do que CYD-TDV. Já a DENVax é altamente imunogênica (Deng et al., 2020). Outras vacinas candidatas em testes clínicos e pré-clínico estão listadas na Quadro 1.1.

Quadro 1.1. Vacinas candidatas para dengue em testes clínicos e pré-clínicos.

Tipo de Vacina	Nome	Estratégia	Fase de teste	Modelo	Referência
Vacina de vírus inativado	S16803	DENV-2 inativado por formalina	Pré-clínico	Murino	Putnak et al., 1996
	TPIV	DENV-1 a 4 inativados por formalina	Pré-clínico	Primatas não-humanos	Sun et al., 2006
Vacina de Subunidade	EDIII-P64K	Tetravalente expressando P64K de <i>Neisseria meningitidis</i> e EDIII dos 4 sorotipos do DENV.	Pré-clínico	Murino	Lazo et al., 2014
	V180	Proteína DENV-80E truncada expressa em células de insetos.	Pré-clínico	Murinos e primatas não-humanos	Clements, et al., 2010
Vacina de Vetores Virais	cAdVaxD (1-2) cAdVaxD (3-4)	Divalente Adenovirus vetorizado expressando prM e E dos DENV.	Pré-clínico	Primatas não-humanos	Holman et al., 2007 Raviprakash et al., 2008
	E85-VRP	Partículas replicativas de vírus da encefalite equina venezuelana expressando a proteína E85 dos quatro sorotipos do DENV	Pré-clínico	Primatas não-humanos	White et al., 2013
Vacina de DNA	D1ME100	Plasmideo recombinante codificando prM/E do DENV-1	Pré-clínico	Primatas não-humanos	Kochel et al., 2000
	TVDV	Plasmideo recombinante codificando prM/E do DENV-1 a 4	Fase I	Humano	Danko et al., 2018

TPIV: Vacina tetravalente de vírus inativado por formalina e purificado; EDIII: Domínio III da proteína E; TVDV: Vacina de DNA tetravalente.

Em relação ao ZIKV, em menos de 3 anos, várias vacinas candidatas passaram por testes pré-clínicos e várias chegaram a ensaios clínicos, conforme mostrados na tabela 1.2 (Fernandez & Diamond, 2017). Conforme diretrizes do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e a experiência com vacinas contra outros flavivírus, como a vacina de vírus inativado purificada contra o vírus da encefalite japonesa (JEV) e a vacina de vírus vivo atenuado contra o vírus da febre amarela (YFV), são amplamente contraindicadas em mulheres grávidas, a menos que os benefícios superam os riscos. Como a população alvo da vacina contra o ZIKV é composta principalmente por mulheres que estão grávidas ou que podem engravidar, a vacina precisará atender a altos padrões de segurança.

As vacinas candidatas precisam provocar uma resposta imunológica forte o suficiente para evitar transferência transplacentária do vírus da mãe para o feto, pois a transmissão vertical do vírus durante a gestação está associada ao desenvolvimento de SCZ (Garg et al., 2018). Porém, não está claro que título de neutralização de anticorpos conseguirão impedir a transmissão vertical, embora os resultados de estudos vacinais em modelos murinos tem demonstrado resultados promissores (Kudchodkar et al., 2018).

Tradicionalmente, as vacinas contra DENV são desenvolvidas utilizando proteínas do E e prM como imunógenos. Essa abordagem resultou na primeira vacina licenciada com aprovação regulatória em vários países (Prompetchara et al., 2019). No entanto, estratégias alternativas estão sendo adotadas devido ao risco de indução de ADE relacionada à vacina, que ficou evidente durante estudos de acompanhamento da vacina CYD-TDV ou Dengvaxia® (Hadinegoro et al., 2015). A proteína NS1 também se mostrou valiosa no desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV, embora com risco potencial de um aumento da gravidade através da ADE entre o DENV e o ZIKV. Anticorpos monoclonais humanos contra a NS1 do ZIKV foram isolados e demonstraram eficácia protetora em modelos murinos através do acoplamento do receptor Fcγ, sem a exigência de neutralização do vírus (Bailey et al., 2019). Esses resultados levam a uma demonstração subsequente da eficácia protetora de um tratamento baseado em vacina de DNA de NS1 em um modelo de desafio letal pelo ZIKV (Bailey et al., 2019).

As vacinas de DNA contra o ZIKV estavam entre as primeiras a serem desenvolvidas simultaneamente por diferentes grupos (Kudchodkar et al., 2018). Todas as abordagens utilizam a expressão de proteínas prM e E do ZIKV. A expressão dessas proteínas nas células de mamíferos leva à montagem de partículas virais imaturas não infecciosas, mas mantém a estrutura e antigenicidade semelhantes a partícula viral madura (Rothman, 2010). Embora as vacinas de DNA ofereçam muitas vantagens como facilidade de produção e adaptação rápida a agentes infecciosos novos e emergentes, uma comparação direta da vacina de DNA com a vacina de vírus inativado purificado (PIV) mostrou que as vacinas PIV, são mais imunogênicas, pelo menos em macacos *reshus* (Abbink et al., 2016). Outras vacinas candidatas em testes clínicos e pré-clínico estão listadas na Quadro 1.2.

Quadro 1.2. Vacinas candidatas para zika em testes clínicos e pré-clínicos.

Tipo de Vacina	Nome	Estratégia	Fase de teste	Modelo	Referência
Vacina de vírus inativado	ZPIV	Vírus inativado por formalina	Fase I	Humano	Abbink et al., 2016
	VRC-ZKADNA085-00-VP	prM e E quimérica do ZIKV e do JEV	Fase I	Humano	Dowd et al., 2016
Vacina de DNA	VRC-ZKADNA090-00-VP	prM e E do ZIKV wild type	Fase I	Humano	Dowd et al., 2016
	GLS-5700	Sequência consenso da prM e E de cepas de ZIKV humanos	Fase I	Humano	Tebas et al., 2017
Vacina de vetor viral	RhAd52-prM-Env	prM e E expressas por um vetor Adenovírus	Pré-clínico	Primatas não - humanos	Abbink et al., 2016
Vacina de vírus atenuado	ZIKV-3'UTR-Δ10 ZIKV-3'UTR-Δ20	Vacina atenuada contendo a deleção de 10 ou 20 nucleotídeos na extremidade 3' UTR do ZIKV (cepa FSS130)	Pré-clínico	Murino e Primatas não humanos	Shan et al., 2017
	ChinZIKV	Quimera do JEV SA14-14-2 e DENV-2 expressando prM e E do ZIKV	Pré-clínico	Murino	Lin et al., 2018

1.6 Diagnóstico diferencial entre DENV e ZIKV: um desafio

Desde o primeiro isolamento do DENV durante a Segunda Guerra Mundial (Hotta, 1952; Sabin, 1952), vários métodos de diagnóstico foram direcionados para a detecção da partícula viral (isolamento do vírus em cultura de células humanas ou de mosquitos; ou detecção direta do RNA viral), de produtos virais (captura e detecção da proteína NS1 secretada) ou da resposta imune do hospedeiro à infecção pelo vírus (através da medição da imunoglobulina M – IgM - específica do vírus e imunoglobulina G - IgG) (revisado por Muller, et al., 2017) (Figura 1.4).

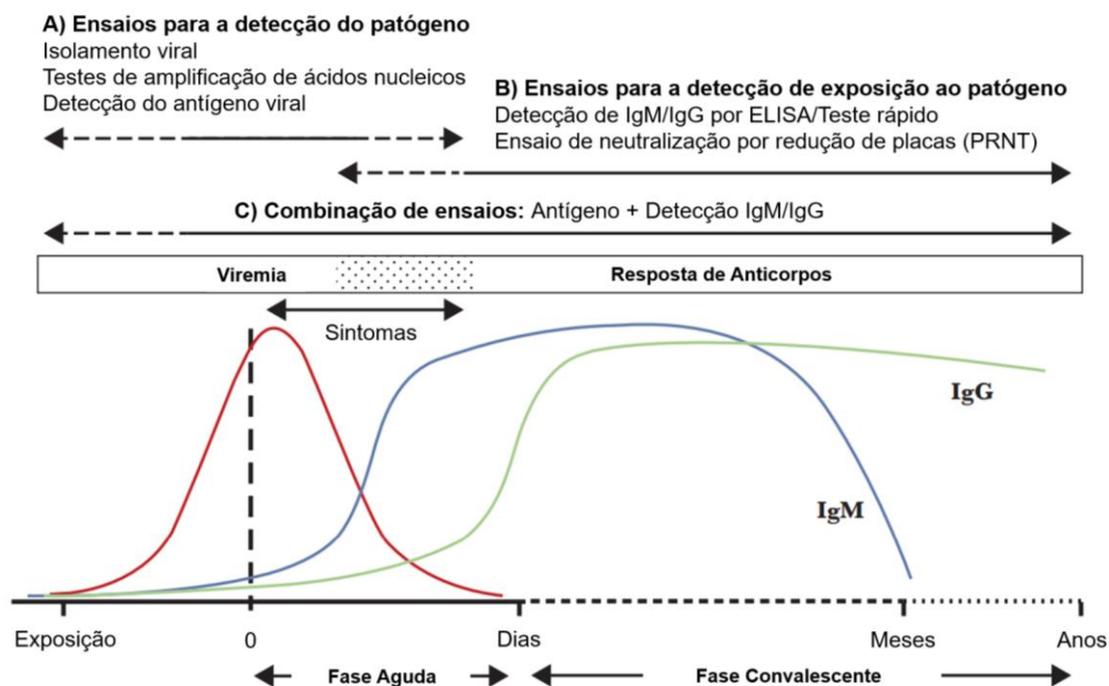


Figura 1.4. Representação esquemática da cinética de infecções por flavivírus. Em infecções por flavivírus, a viremia (linha vermelha) normalmente precede o início dos sintomas e sintomas clínicos e perdura por alguns dias após o início dos sintomas. **(A)** Durante a fase aguda, as infecções por flavivírus são mais bem detectadas por isolamento viral, testes de amplificação de ácidos nucleicos e ensaios de detecção de antígenos (por exemplo, o teste NS1 do vírus da dengue). **(B)** Durante o curso da infecção, são produzidos anticorpos da imunoglobulina M (IgM - linha azul) e imunoglobulina G (IgG - linha verde) específicos para o vírus e podem ser usados para detectar a exposição ao patógeno. As infecções atuais podem ser diagnosticadas pela detecção de anticorpos IgM e IgG em amostras de fase aguda e convalescente emparelhadas (detecção de soroconversão). Os anticorpos IgM podem persistir por vários meses, e sabe-se que os anticorpos IgG persistem por vários anos. **(C)** ensaios de combinação que detectam antígeno e anticorpos são aplicáveis em todo o espectro da doença. **Fonte:** Adaptado de Gonçalves, A., et al. **Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report.** *J Infect Dis.* 217(7):1060-1068. doi: 10.1093/infdis/jix678. 2018.

O diagnóstico diferencial entre dengue e zika constitui um desafio para a comunidade científica, uma vez que: (i) entre os flavivírus humanos patogênicos,

DENV e ZIKV estão mais intimamente relacionados entre si, com 55,1% a 56,3% de identidade de sequência de aminoácidos, representando um desafio principalmente em regiões nos quais o ZIKV e o DENV são endêmicos (revisado por Ngonu & Shrestha, 2018); (ii) grande parte dos indivíduos infectados por esses vírus são assintomáticos ou então, nos casos sintomáticos, os pacientes exibem um conjunto de sintomas clínicos iniciais semelhantes (Duffy et al., 2009); (iii) ZIKV pode ser transmitido sexualmente, inclusive após infecção assintomática; e (iv) principalmente nas mulheres infectadas pelo ZIKV na gestação, há uma associação bem estabelecida com o aparecimento de casos de microcefalia e outros defeitos congênitos (Tsai et al., 2017).

A seleção do teste de diagnóstico depende do momento da coleta de amostras e de sua finalidade. No período virêmico das infecções pelos flavivírus, a carga viral é transitória e de curta duração; o tempo de liberação do vírus pelas células e a presença do RNA viral pode ser variável entre os tipos de amostra (por exemplo, soro, sangue total, urina, saliva e líquido amniótico) (Schaub et al., 2017) e condições do hospedeiro (por exemplo, mulheres grávidas, crianças, adultos) (Suy et al., 2016). Além disso, como a maioria das infecções por DENV e ZIKV é assintomática, as pessoas acabam por buscar um diagnóstico fora do período de detecção do RNA viral. Por isso, um resultado negativo do isolamento viral e/ou do teste de ácido nucleico não exclui a presença de uma infecção atual.

Logo após o período virêmico, os testes sorológicos são os recomendados. Embora para dengue, os testes sorológicos tenham sido clinicamente validados, sua especificidade diminuiu em consequência da ampla reatividade cruzada das respostas de anticorpos resultantes de infecções anteriores por flavivirais, como visto pelo recente surto do ZIKV, e/ou vacinação contra febre amarela (van Meer et al., 2017). A seguir, serão apresentadas as abordagens tradicionais e recentes para o diagnóstico da infecção por DENV ou ZIKV.

O isolamento viral tem sido o método tradicional para detectar a infecção. Para isso, amostras clínicas coletadas de pacientes são cultivadas em uma variedade de linhagens celulares de mosquitos (AP-61, Tra-284, AP64, C6/36 e CLA-1) ou de mamíferos (LLCMK2, Vero e BHK-21) (revisado por Muller et al., 2017). Em amostras de sangue coletadas de pacientes infectados com doença

febril até o quinto dia do início dos sintomas, os resultados em geral são bem sucedidos. No entanto, o isolamento viral de pacientes com infecção secundária é dificultado pela produção rápida de anticorpos de reatividade-cruzada no início da fase aguda da doença, formando imunocomplexos com o vírus circulante (Teles et al., 2005). Esse método não é particularmente prático, pois o isolamento pode levar dias ou semanas para ser realizado (Lanciotti et al., 1992).

Métodos moleculares, como RT-PCR, têm sido utilizados no diagnóstico de infecção. Os métodos baseados em PCR fornecem o diagnóstico de DENV no mesmo dia ou no dia seguinte, ainda durante a fase aguda da doença. Lanciotti e colaboradores (1992) originalmente relataram um ensaio de RT-PCR altamente sensível e que ocorre em duas etapas. Uma grande vantagem das técnicas baseadas em PCR é que o RNA viral pode ser detectado desde o início da doença e é sensível, específico, rápido, mais simples e barato que os métodos de isolamento viral (Deubel et al., 1990). Uma desvantagem do método é que exige um laboratório com equipamento especializado e equipe treinada para sua realização, uma opção difícil para ser realizada em regiões com poucos recursos, onde a dengue é endêmica. Apesar da disponibilidade de kits comerciais, a maior parte dos métodos de RT-PCR relatados são desenvolvidos internamente e carecem de padronização (Najioullah et al., 2014).

A detecção de NS1 no sangue de pacientes usa uma abordagem de ELISA de captura de antígenos descrita pela primeira vez em 2000 (Young et al., 2000). A proteína viral NS1 é um alvo ideal para o diagnóstico, porque é secretada pelas células infectadas. Além disso, a NS1 é encontrada em altos níveis circulantes no sangue de indivíduos infectados e pode ser detectada desde o início dos sintomas até o 9º dia após o início da doença. A NS1 pode ser detectada ao mesmo tempo que o RNA viral e antes que uma resposta de anticorpo seja montada durante as infecções primárias. Pode ser vista como um marcador substituto para viremia, onde o nível de NS1 é correlacionado com o título viral (Young et al., 2000; Alcon et al., 2002). O ELISA de captura quantitativo, verificou que a NS1 é secretada em altos níveis (dentro da faixa de ng/mL a µg/mL) (Libraty et al., 2002).

Esses primeiros estudos levaram ao desenvolvimento de ELISA de captura NS1 e testes rápidos para fins comerciais. O desenvolvimento comercial

do NS1 como ferramenta de diagnóstico revolucionou o diagnóstico da dengue, pois fornece ensaios simples e de baixa tecnologia, com alta sensibilidade e especificidade. Uma limitação da detecção de NS1 para pacientes com infecção secundária é o rápido aumento nos anticorpos de reatividade-cruzada de NS1 durante a fase aguda da doença. Esses anticorpos formam imunocomplexos com a NS1 secretada que não podem ser facilmente detectados por ensaios de captura. Consequentemente, a cinética da detecção de NS1 ao longo da doença durante infecções secundárias é menor que em infecções primárias (revisado por Muller, et al., 2017).

Na fase de convalescência da infecção, os métodos sorológicos são preferidos, embora amostras pareadas das fases aguda e convalescente sejam necessárias para distinguir as infecções atuais das anteriores (Peeling et al., 2010). Existem inúmeras abordagens disponíveis para o diagnóstico sorológico, incluindo ensaios de inibição da hemaglutinação, testes de fixação de complemento, testes de anticorpos imunofluorescentes indiretos e testes de neutralização de redução de placa, ELISA de captura de anticorpos IgM e IgG, dentre outros (revisado por Muller, et al. 2017).

O padrão de referência para a detecção de anticorpos neutralizantes continua sendo a metodologia de Teste de Neutralização de Redução de Placas (PRNT) que embora de difícil e longa execução, é o teste que oferece uma maior especificidade. Estudos visando uma melhor padronização da metodologia clássica do PRNT estão em andamento, incluindo o uso de vírus marcados com luciferase que reduz o tempo de execução da metodologia, mantendo a precisão do PRNT convencional (Shan et al., 2017).

Como em todos os ensaios baseados na detecção de anticorpos, o período inicial da doença aguda geralmente apresenta uma janela de detecção negativa. No entanto, os ELISA de captura de anticorpos IgM e IgG tornaram-se relativamente rotineiros. A IgM pode aparecer entre o 3º a 5º dias após a infecção primária, atingindo o pico após várias semanas de recuperação e permanecendo em níveis detectáveis por vários meses. A IgG geralmente não aparece durante a fase aguda da doença primária. No entanto, durante a infecção secundária, há uma resposta rápida de IgG aos epítomos compartilhados em múltiplas proteínas virais entre o sorotipo da infecção primária e o sorotipo infectante, com o IgG

aparecendo no 3º dia após o início da doença. Consequentemente, quando realizada em paralelo, a detecção de IgM e IgG pode fornecer uma indicação de infecção primária ou secundária com base na proporção de IgM e IgG durante a fase aguda da doença (revisado por Muller, et al., 2017).

A detecção da infecção por DENV através da sorologia é complicada em áreas onde há a cocirculação de flavivírus. Semelhante a outros flavivírus, a proteína E do DENV e ZIKV contém alguns dos principais epitopos capazes de promover uma forte resposta imune humoral. No entanto, apesar de uma alta similaridade, estudos sugerem diferenças eletrostáticas significativas nos principais epítomos antigênicos das proteínas NS1 do ZIKV e do DENV, possivelmente levando a uma menor reatividade cruzada de anticorpos e uma maior especificidade entre os ensaios diagnósticos baseados na proteína NS1 do ZIKV (Song et al., 2016). Anticorpos neutralizantes da classe IgG se desenvolvem logo após a resposta de IgM e podem persistir por décadas. Estudo recente comparou 4 testes sorológicos anti-ZIKV por ELISA. Para isto, amostras de soro sequenciais, bem caracterizadas, e oriundas de uma coorte nicaraguense, indicou variações na sensibilidade do ensaio, dependendo da exposição prévia ao DENV, quando comparadas a amostras obtidas de indivíduos flavivírus-naives (Balmaseda et al., 2018).

Lanciotti e colaboradores (2008) observaram que a especificidade do PRNT para o ZIKV diminui em pacientes com exposição prévia ao DENV. Por isso, para um número significativo de indivíduos com infecções anteriores por DENV, os resultados de IgM anti-ZIKV de reatividade cruzada permanecem sem confirmação pelo PRNT, uma limitação que é particularmente problemática para o diagnóstico de gestantes (Granger et al., 2017).

A liberação da NS1 solúvel de ZIKV na fase aguda no soro de pacientes ainda não foi verificada. As proteínas NS1 recombinantes foram usadas em um microarray de proteínas sorológicas multiplex para a detecção de IgM e IgG anti-DENV, -WNV e -JEV, demonstrando alta sensibilidade e limitada reatividade-cruzada, sugerindo que a NS1 pode representar um substrato antigênico eficiente (Cleton et al., 2015).

Estudo recente avaliou a performance de um novo ELISA capaz de dosar anticorpos das classes IgM e IgG anti-ZIKV baseado na NS1 recombinante do

ZIKV. Segundo os autores, em amostras confirmadas de ZIKV coletadas há mais de 6 dias após o início dos sintomas, a sensibilidade ao ELISA foi de 58,8% para IgM, 88,2% para IgG e 100% para IgM/IgG, com especificidade de 99,8%. Não foi detectada reatividade-cruzada com anticorpos anti-DENV, indicando que esse teste oferece alta especificidade e baixa reatividade cruzada (Steinhagen et al., 2016).

Em 2017, Tsai e colaboradores corroboraram o uso do ELISA baseado na proteína NS1 do ZIKV e NS1 do DENV em amostras de soro/plasma agudos, convalescentes e pós-convalescentes de casos confirmados por RT-PCR de pacientes com ZIKV primário (definidos como aqueles pacientes que nunca foram expostos a outros flavivírus), ZIKV com exposição prévia ao DENV, secundária por DENV e infecção primária por DENV-1. Os ELISAs de IgM anti NS1 do ZIKV e IgG anti-NS1 do ZIKV combinados detectaram a infecção por ZIKV com uma sensibilidade de 95% e especificidade de 66,7%. A reatividade cruzada por IgG anti-NS1 do ZIKV por amostras de casos secundários de infecção por DENV variou de 66,7% a 28,1% (dentro de 1 mês a 1-2 anos após a doença, respectivamente). Assim, os autores indicam que a adição de ELISA de IgG anti-NS1 do DENV-1 pode distinguir a infecção primária por ZIKV; a razão de absorvância do reconhecimento da NS1 do ZIKV para pelo ELISA de IgG anti-NS1 do DENV-1 pode distinguir o ZIKV de infecções anteriores por DENV e infecções secundárias por DENV com uma sensibilidade de 87,5% e especificidade de 81,3%. Esses achados foram corroborados pela análise de amostras sequenciais.

Balmaseda e colaboradores (2017) identificaram anticorpos monoclonais (mAbs) reativos a NS1 derivados de indivíduos infectados com ZIKV e DENV. A análise de sua reatividade cruzada revelou que a maioria dos mAbs induzidos em indivíduos expostos apenas ao DENV ou ZIKV eram apenas específicos para os vírus infectantes. Por outro lado, numerosos mAbs isolados de doadores infectados com ZIKV imunes ao DENV reagiram de maneira cruzada com os antígenos da NS1 do ZIKV e do DENV. Os estudos de competição de anticorpos identificaram dois locais no NS1 que foram reconhecidos por mAbs específicos para o ZIKV e não competiram por anticorpos de reatividade cruzada (Stettler et al. 2016). Um desses mAbs, designado como ZKA35 é direcionado para o local

S2 na NS1 e foi usado como sonda para o desenvolvimento de um ensaio sorológico de bloqueio de ligação com a NS1.

Vários grupos avaliaram os ELISA de IgM e IgG anti-NS1 do ZIKV comercialmente produzidos pela Euroimmun (Lubeck, Alemanha). Todos os relatórios sugerem que os kits da Euroimmun fornecem sensibilidade limitada, variando de 54% a 79%, em soros coletados 30 dias após o início dos sintomas com infecção pelo ZIKV confirmado por RT-PCR ou PRNT (L'Huillier et al., 2017; Kadkhoda et al., 2017; Steinhagen et al., 2016; Lustig et al., 2017). Curiosamente, a maioria desses estudos mostrou que a interpretação combinada dos resultados dos ELISA IgM e IgG anti-ZIKV da Euroimmun aumenta a sensibilidade em mais de 88% na mesma coorte de pacientes. A especificidade dos ELISAS anti-ZIKV da Euroimmun tem se mostrado acima de 95% para pacientes com exposição prévia aos flavivírus relacionados como DENV, WNV ou JVE. No entanto, L'Huillier e colaboradores (2017) têm sugerido uma frequente reatividade cruzada entre pacientes expostos a DENV (L'Huillier et al., 2017; Kadkhoda et al., 2017; Huzly et al., 2016).

Para a maioria dos pacientes sintomáticos infectados pelo ZIKV, anticorpos da classe IgM anti-ZIKV já podem ser detectados após uma semana ou antes da infecção, permanecendo detectáveis por mais de 2 meses (Paz-Baile et al., 2017). Esta soropersistência é consistente com as respostas humorais para outros flavivírus, incluindo o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o DENV, para os quais estudos de modelagem sugerem que o tempo médio para os títulos de IgM diminuírem varia de 5 a 6 meses (Busch et al., 2008).

O diagnóstico de infecções por ZIKV é desafiador, porque a única ferramenta específica é a detecção direta do RNA viral detectável no soro até 7 dias após o início dos sintomas e, também, na saliva, urina (cerca de 20 dias) e sêmen (> 20 dias) (Lanciotti, et al., 2008; Gourinat et al., 2015; Bingham et al., 2016; Reusken et al., 2016).

O ritmo de desenvolvimento de testes moleculares para a detecção do RNA do ZIKV aumentou rapidamente. Regiões altamente conservadas do genoma do ZIKV, como as regiões flanqueantes 5' e 3' não codificantes, são frequentemente utilizados como sequências alvos de sondas e primers para realização da RT-PCR. Contudo, as regiões E, NS1, NS2, NS3, NS5 e região do loop de fusão,

também vem sendo usadas com sucesso para desenvolver ensaios de RT-PCR para ZIKV (Waggoner et al., 2016; Musso & Gubler, 2016).

No plasma ou soro, tipos de amostras mais frequentemente utilizados para detecção do RNA do ZIKV, os títulos virais variam de 3,7 a 5,0 x 10⁶ cópias/mL (média de 9,9 x 10⁴ cópias/mL) nos primeiros 7 dias após o aparecimento dos sintomas. Esse mesmo estudo longitudinal com viajantes que retornaram da região do Caribe e América Central e Sul, mostrou uma detecção prolongada de ZIKV em amostras de sangue total comparado as amostras de plasma ou soro, com durações médias de viremia por ZIKV de 22 e 10 dias, respectivamente (Mansuy et al., 2017).

Vários estudos demonstraram que, devido a carga viral prolongada e a facilidade de coleta, a urina é um tipo de amostra extremamente vantajosa para a detecção do RNA do ZIKV (Bingham et al., 2016). O RNA do ZIKV foi detectado com segurança em 93% dos pacientes com 7 a 20 dias após o início dos sintomas. Neste estudo, as cargas virais variavam de 3,8 x 10³ a 2,2 x 10⁸ cópias/mL pelo RT-PCR direcionados para genes das proteínas prM e E do ZIKV (Bingham et al., 2016; Musso & Gubler, 2016). A estabilidade do RNA do ZIKV em amostras de urina demonstrou uma degradação significativa do RNA dependendo da temperatura. Com base nessas descobertas, os autores sugerem a melhor forma de armazenamento da amostra é a 4°C, com adição de um estabilizador de ácido nucleico para minimizar o risco de degradação do RNA e resultados falso-negativos (Tan et al., 2017).

O uso da saliva como amostra para a detecção do RNA do ZIKV também foi avaliado, devido à facilidade de coleta principalmente para neonatos e crianças pequenas. O RNA do ZIKV pode ser detectado na saliva do 7° ao 19° dias após o início dos sintomas, embora sua maior sensibilidade seja com 5° dia (Bingham et al., 2016). Apesar da facilidade de coleta, os métodos de coleta e o processamento das amostras são inconsistentes, portanto, é bom garantir que os pacientes positivos para o ZIKV na saliva também foram positivos em outros tipos de amostras (Landry & St. George, 2017).

A detecção do RNA do ZIKV no sêmen foi considerada, principalmente pela avaliação dos riscos de infecção para os fetos. Entre 23 pacientes do sexo masculino que relataram uma doença leve, autolimitada, consistente com a

infecção pelo ZIKV, 56,5% apresentavam ZIKV detectável com altos números de cópias (ciclo limiar de 30 ciclos) 28 dias após o início dos sintomas (Atkinson et al., 2017; Pyke et al., 2014). Outros estudos indicaram que a detecção de RNA no sêmen é de 4 a 6 meses, com propagação em cultura de células com até 69 dias (Garcia-Bujalance et al., 2017; Paz-Bailey et al., 2019).

O líquido amniótico, a placenta e tecido fetal são amostras inestimáveis para a identificação da infecção neonatal por ZIKV. Estudo prospectivo de 8 mulheres grávidas na Ilha Martinica, observou que o RNA do ZIKV foi detectado em 5 amostras de tecido cerebral fetal pós-morte, mas variavelmente no tecido placentário, líquido amniótico, sangue fetal ou materno-fetal no momento do parto ou após o término da gestação, possivelmente devido a natureza transitória da viremia nessas amostras (Schaub, et al., 2017). Evidências não suportam totalmente a transmissão pelo ZIKV via amamentação e nenhum dos bebês sofreu qualquer tipo de complicação (Colt, et al., 2017).

Desta forma, ensaios de diagnóstico capazes de discriminar a infecção por DENV ou ZIKV são extremamente necessários. Vários grupos vem utilizando diferentes abordagens, incluindo teste de avidéz de IgG anti-ZIKV, teste de bloqueio de ligação ou uso de multianálises com algoritmos sorológicos sugerem que, com o refinamento, essa diferenciação possa ser possível no futuro (Balmaseda, et al., 2017; Tsai, et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Entre 2015 e 2016, epidemias causadas pelos vírus ZIKV e Chikungunya (CHIKV), especialmente em regiões endêmicas de DENV, anunciaram um cenário epidemiológico alarmante e um desafio à saúde pública no Brasil (Ministério da Saúde do Brasil, 2020). Os três vírus compartilham os humanos como hospedeiro vertebrado e *A. aegypti* como principal vetor e, ainda, fatores biológicos, ecológicos e econômicos que favorecem a ocorrência de coinfeções por dois ou mais vírus. Diante desse cenário, *buscamos avaliar o perfil da resposta imunológica de pacientes monoinfectados pelo DENV ou ZIKV comparado aos coinfectados pelo DENV e ZIKV, na tentativa de contribuir ao entendimento dos mecanismos imunológicos de proteção e/ou patogênese do hospedeiro coinfectado.*

Em geral as infecções por ZIKV e DENV causam sintomas leves e autolimitados. No caso da Zika, ocasionalmente a infecção pode levar a um espectro de malformações em neonatos, coletivamente denominado de Síndrome da Zika Congênita (Song, et al., 2017). Existem poucos estudos sobre a imunidade na infecção pelo ZIKV durante a gravidez em modelos experimentais (Regla-Nava et al., 2018) e um estudo recente em pacientes (Reynolds et al., 2020). Desta forma, *é essencial determinar se a resposta imunológica de memória específica ao ZIKV desenvolvida pelas mães infectadas durante a gravidez e de seus filhos expostos ao vírus por via transplacentária é efetiva e duradoura.*

Por fim, a OMS identificou como urgência o desenvolvimento de testes de diagnósticos confiáveis da infecção pelo ZIKV, principalmente em mulheres grávidas (Landry & St George, 2017). Isso porque os testes sorológicos atuais são pouco específicos em decorrência da alta reatividade-cruzada entre proteínas do ZIKV e de outros flavivírus, particularmente DENV. *Assim, novas abordagens para desenvolvimento de testes são necessárias como o uso de epítomos lineares de células B das regiões virais não estruturais (NS) 1, NS5 e envelope (E) do ZIKV e avaliamos sua capacidade de ligação aos IgG de doadores com histórico de infecção por ZIKV.*

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune efetora de indivíduos com infecção aguda pelos arbovírus DENV e/ou ZIKV, assim como a resposta imune de memória em indivíduos expostos ao ZIKV durante a gravidez e por fim, estabelecer uma abordagem que auxilie o diagnóstico diferencial das infecções humanas por DENV ou ZIKV.

3.2 Objetivo Específicos

1. Avaliar o perfil da resposta imunológica efetora de linfócitos T de pacientes monoinfectados pelo DENV ou ZIKV e daqueles coinfectados pelo DENV e ZIKV durante a fase aguda da infecção;
2. Avaliar o *status* imunológico e a geração da memória de linfócitos T de mulheres infectadas pelo ZIKV durante gravidez e de seus filhos, ambos com infecção já resolvida, através da estimulação *in vitro* com epítomos do ZIKV restritos aos linfócitos T;
3. Realizar predição, síntese de epítomos lineares direcionados para linfócitos B das regiões não estruturais (NS) 1, NS5 e envelope (E) do ZIKV e avaliar a capacidade desses epítomos se ligarem aos IgG de doadores adultos com histórico de infecção por ZIKV e/ou DENV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

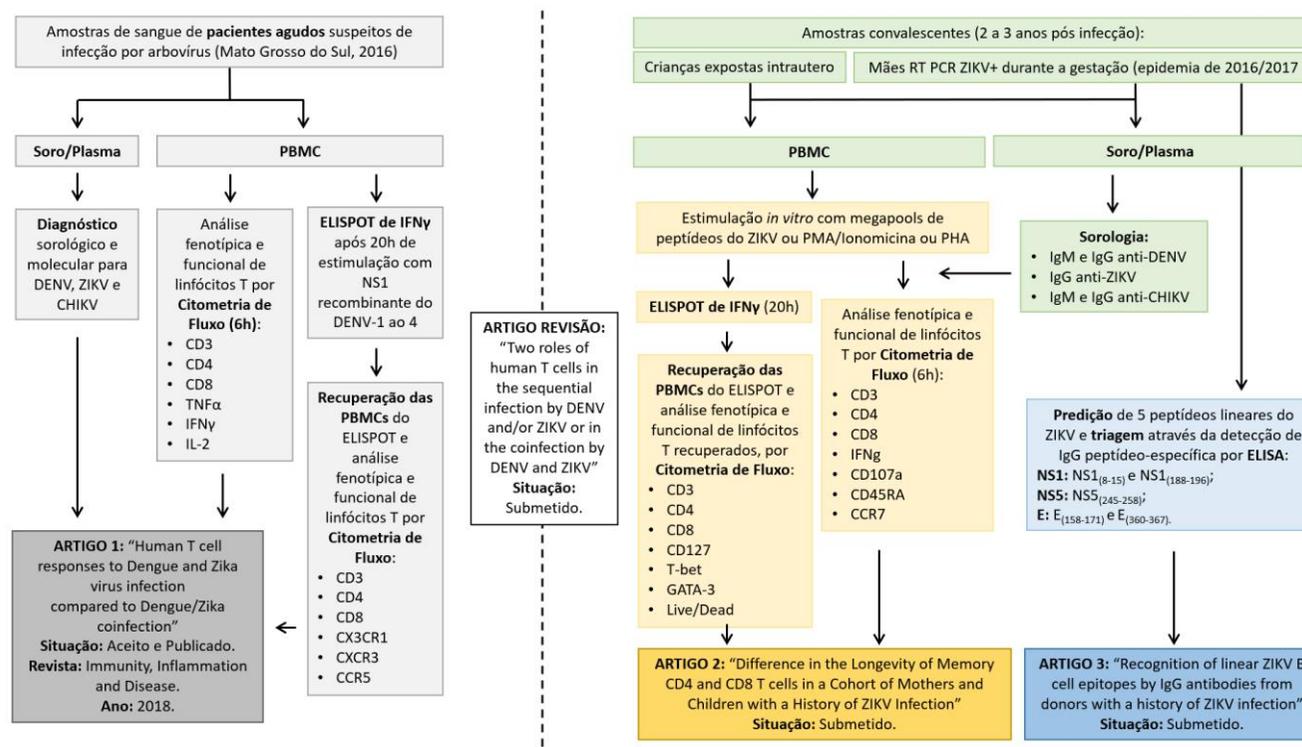


Figura 4.1. Desenho experimental do estudo. Parte desse estudo se deu em uma coorte de pacientes infectados pelos vírus DENV, ZIKV ou DENV/ZIKV na epidemia de 2016 no estado do Mato Grosso do Sul. Todos os pacientes encontravam-se na fase aguda da doença. Nestes, a resposta imunológica desencadeada pelos linfócitos T de pacientes mono infectados pelo DENV ou ZIKV foi comparada aos co infectados simultaneamente pelo DENV e pelo ZIKV. Outra parte do estudo se deu em uma coorte de mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gravidez e de seus filhos, alguns com acometimentos neurológicos, na epidemia de 2016-2017 no Rio de Janeiro. Para realização desse estudo, as amostras de mães e filhos foram coletadas em 2018-2019, quando ambos já se encontravam na fase de recuperação da doença. Nestes, o status imunológico e a geração da memória dos linfócitos T foi avaliado mediante a exposição das células dos pacientes a epitopos do ZIKV, utilizando-se diferentes ensaios *in vitro*. Por fim, amostras de pacientes imunes ou expostos previamente ao DENV nas epidemias de 2007, 2008 e 2010, períodos nos quais ZIKV não circulava no Brasil, foram utilizados para avaliar a especificidade de peptídeos lineares de linfócitos B de regiões proteicas do ZIKV, pensados previamente como alvos de detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV para fins de validar um teste de diagnóstico específico.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados sob a forma de artigos científicos publicados e/ou em fase de submissão, e serão listados na ordem em que serão apresentados e discutidos.

Artigo 1: Badolato-Corrêa et al., *Immunity, Inflammation and Disease*. 2018. 6(2): 194–206. doi: 10.1002/iid3.203. (Qualis B1).

Resposta de linfócitos T humanos às infecções pelos vírus Dengue e Zika em comparação com a coinfeção por Dengue/Zika

Entre 2015 e 2016, epidemias causadas pelo ZIKV em regiões endêmicas de DENV favoreceram a ocorrência simultânea de coinfeções por estes dois vírus. Diante desse cenário, buscamos *avaliar o estado de ativação dos linfócitos T na infecção aguda de pacientes monoinfectados por DENV ou ZIKV (mono-DENV ou mono-ZIKV) comparado aos pacientes coinfectados por DENV e ZIKV (co-DENV/ZIKV) e controles saudáveis expostos ao DENV.*

Inicialmente, avaliamos o estado de ativação dos linfócitos T pela expressão *ex vivo* de receptores de quimiocinas CCR5, CX3CR1 e CXCR3 por citometria de fluxo. Esses receptores caracterizam subpopulações de linfócitos T com capacidade migratória e função efetora. Os pacientes co-DENV/ZIKV apresentaram altas frequências de linfócitos T CD4⁺ expressando CCR5 ou CX3CR1, mas não de CXCR3, comparados aos doadores. De forma semelhante, nos pacientes mono-DENV e mono-ZIKV, observamos uma propensão a altas frequências de linfócitos T CD4⁺ expressando CCR5 ou CX3CR1 ($p < 0,0571$). Por outro lado, os três grupos de pacientes infectados apresentaram aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CCR5, CX3CR1 ou CXCR3 comparados aos doadores.

Em seguida, avaliamos a frequência de linfócitos T produtores de citocinas pela marcação intracelular por citometria de fluxo. O IFN- γ tem sido o parâmetro mais utilizado para medir se uma resposta imune natural ou induzida

por vacina é eficaz. Em particular, TNF- α é capaz de induzir morte de uma variedade de patógenos intracelulares e a IL-2, mesmo sem uma função efetora direta, promove expansão de linfócitos T, amplificando a resposta imune celular. De forma interessante, mesmo sem estimulação antigênica *in vitro*, observamos frequências baixas, mas detectáveis de citocinas. Já os pacientes co-DENV/ZIKV apresentaram frequências significativamente reduzidas de linfócitos T CD4⁺ produtores de TNF- α comparado aos pacientes mono-DENV e doadores. Já nos linfócitos T CD8⁺, detectamos um aumento significativo da frequência de células produtoras de IFN- γ nos pacientes co-DENV/ZIKV comparado aos doadores. Todos os grupos estudados apresentaram frequência baixa de linfócitos T CD8⁺ produtores de TNF- α .

A frequência de linfócitos T produtores de citocinas por si só não é suficiente para prever uma resposta imune eficiente. Desta forma, para fornecer evidências prospectivas da qualidade da resposta dos linfócitos T, é necessário avaliar a capacidade dessas células T produzirem mais de uma citocina, ou seja, de serem multifuncionais. De acordo com nossos dados, pacientes co-DENV/ZIKV apresentaram menor frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ /TNF- α comparado aos mono-DENV e doadores e menor frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de TNF- α /IL-2 comparado aos mono-DENV. Os pacientes mono-ZIKV apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores apenas de IFN- γ comparado aos doadores. Em geral, não vimos diferença estatística em relação aos linfócitos T CD8⁺ multifuncionais nos pacientes agudos comparados aos doadores, mas todos os pacientes agudos infectados apresentaram maior frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores apenas de IFN- γ comparado aos doadores.

A proteína NS1 viral compartilha de 53 a 56% de identidade de aminoácidos entre DENV e ZIKV. Como observado nas características clínicas e laboratoriais dos pacientes, em 75% dos pacientes agudos e em todos os doadores saudáveis foram detectados anticorpos IgG anti-DENV, indicando exposição prévia ao DENV. Portanto, fomos avaliar a resposta celular quanto à produção de IFN- γ de todos os grupos de indivíduos em culturas estimuladas com PHA ou *pool* de NS1 dos 4 sorotipos DENV pelo ensaio de ELISPOT. Os

dados de células produtoras de IFN- γ (spot forming cells, SFC) frente à PHA indicam que todos os indivíduos são imunocompetentes. No entanto, as células de doadores saudáveis responderam fortemente ao NS1 DENV, enquanto as células dos pacientes agudos, independente de já terem sido expostos ao DENV, não responderam.

ORIGINAL RESEARCH

Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection

Jessica Badolato-Corrêa¹, Juan Camilo Sánchez-Arcila¹, Thiara Manuele Alves de Souza¹, Luciana Santos Barbosa^{1,2}, Priscila Conrado Guerra Nunes¹, Monique da Rocha Queiroz Lima¹, Mariana Gandini³, Ana Maria Bispo de Filippis⁴, Rivaldo Venâncio da Cunha^{5,6}, Elzinandes Leal de Azeredo¹, & Luzia Maria de-Oliveira-Pinto ¹

¹Laboratory of Viral Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Genetics, Institute of Paediatrics and Puericulture Martagão Gesteira (IPPMG), Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratory of Cellular Microbiology, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratory of Flavivirus, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Clinical Medicine, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brazil

⁶Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Keywords

Dengue, Zika: T lymphocytes

Correspondence

Luzia Maria de-Oliveira-Pinto, PhD,
Laboratório de Imunologia Viral, sala B119,
Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, Fundação
Oswaldo Cruz,
Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365,
Manguinhos, ZIP: 21045-900, Rio de Janeiro,
Brasil.
Tel: +55(21)2562-1732;
E-mail: lpinto@ioc.fiocruz.br,
lmopnogueira@gmail.com

Funding information

This work was financially supported by IOC/FIOCRUZ and FAPERJ. Juan Camilo Sánchez-Arcila is recipient of Post-doctoral fellowship FAPERJ E-26/202.011/2016.

Received: 1 August 2017; Revised: 13 September 2017; Accepted: 4 October 2017

Immunity, Inflammation and Disease (2017)

doi: 10.1002/iid3.203

Jessica Badolato-Corrêa and Juan Camilo Sánchez-Arcila contributed equally to this work.

Abstract

Introduction: Zika virus (ZIKV) and dengue virus (DENV) co-circulated during latest outbreaks in Brazil, hence, it is important to evaluate the host cross-reactive immune responses to these viruses. So far, little is known about human T cell responses to ZIKV and no reports detail adaptive immune responses during DENV/ZIKV coinfection.

Methods: Here, we studied T cells responses in well-characterized groups of DENV, ZIKV, or DENV/ZIKV infected patients and DENV-exposed healthy donors. We evaluated chemokine receptors expression and single/multifunctional frequencies of IFN γ , TNF, and IL2-producing T cells during these infections. Even without antigenic stimulation, it was possible to detect chemokine receptors and IFN γ , TNF, and IL2-producing T cells from all individuals by flow cytometry. Additionally, PBMCs' IFN γ response to DENV NS1 protein and to polyclonal stimuli was evaluated by ELISPOT.

Results: DENV and ZIKV infections and DENV/ZIKV coinfections similarly induced expression of CCR5, CX3CR1, and CXCR3 on CD4 and CD8 T cells. DENV/ZIKV coinfection decreased the ability of CD4⁺ T cells to produce IFN γ ⁺, TNF⁺, TNF⁺ IFN γ ⁺, and TNF⁺ IL2⁺, compared to DENV and ZIKV infections. A higher magnitude of IFN γ response to DENV NS1 was found in donors with a history of dengue infection, however, a hyporesponsiveness was found in acute DENV, ZIKV, or DENV/ZIKV infected patients, even previously infected with DENV.

Conclusion: Therefore, we emphasize the potential impact of coinfection on the immune response from human hosts, mainly in areas where DENV and ZIKV cocirculate.

Introduction

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) belong to Flaviviridae family and both diseases affect significantly

human health. These viruses are mainly transmitted by *Aedes aegypti* or *albopictus* infected mosquitoes. Other routes of infection, including sexual, maternal, and blood transfusions, have been recently reported for ZIKV [1]. DENV

and ZIKV, like other flaviviruses, are single-stranded, positive-sense RNA viruses with a genome of 10.7 kb and two flanking non-coding regions (5' NCR and 3' NCR). The open reading frame encodes one polyprotein with three structural proteins: capsid, pre-membrane/membrane, and envelope and seven nonstructural proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5 [2]. Four serotypes of DENV (DENV-1 to -4), antigenically distinct have been described [3]. In ZIKV, two major lineages, African (Nigeria, Senegal, and Uganda strains) and Asian (Malaysia 1966, Yap State 2007, and Cambodia 2010) have been described based on full genome sequences of the ORFs [4]. The four DENV serotypes share approximately 70% amino acid identity with each other, while ZIKV displays an overall 43% homology with DENV (with up to 68% identity for more conserved non-structural proteins) [1].

Dengue incidence has increased 30-fold in the last five decades [5]. Currently, dengue is endemic in 128 countries, most of them developing nations, affecting approximately 3.97 billion people annually [6]. The incidence of dengue increased greatly over the past two decades in Brazil, affecting all regions of the country, except the South [7]. Forty years after its discovery, ZIKV reemerged during a 2007 outbreak on Yap Island in Micronesia, continued in 2013 in French Polynesia [8–10], and in 2014 moved to multiple Pacific islands. At the end of that period, it was introduced to South America [11–15]. In Brazil, the first reports of suspected cases occurred in the Northeast, with a peak during the first quarter of 2015, but it was only confirmed in April 2015. The epidemic continued spreading in May 2016. Since then, autochthonous transmission of ZIKV had been reported in 42 countries and territories in the Region of the Americas [11, 13, 16, 17]. Due to lack of reliable official data, Brazilian Ministry of Health estimated the number of cases based on reports of attack rates from other countries.

Dengue infection may be asymptomatic or cause a febrile illness (dengue fever), accompanied by severe headaches, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, gastro-intestinal complications, liver inflammation, and skin rashes. When fever subsides, patients may develop a more severe life-threatening condition, characterized by an increase in vascular permeability, plasma leakage and hemorrhagic manifestations, leading to hypovolemic shock [18]. Clinical features of ZIKV infection resemble—but are generally milder—those caused by DENV. It could range from asymptomatic infection to a febrile illness characterized by rash, fever, conjunctivitis, arthralgia, and arthritis [10, 14, 19]. Unexpectedly, ZIKV outbreak also had a high attack rate and revealed an association with the appearance of Guillain-Barré syndrome in adults [14, 20] and devastating congenital birth defects, including microcephaly in the developing fetus. It makes of Zika a major emerging public health problem [14, 21, 22].

T cells have an essential role in protection against a variety of infections. Indeed, the development of successful vaccine

formulations will require the generation of potent and long-lasting T-cell responses. However, there are still no clearly defined immune correlates of protection for these infections [23]. The role of T cells during dengue infection is still controversial, with studies supporting either an immunoprotective or immunopathological role (reviewed in [24]). Pioneer studies proposed that T cells have a detrimental role during secondary dengue infections in a process termed “original antigenic sin.” Based on this theory, cross-reactive T cells generated during primary infection, which recognize secondary-infected DENV serotype with low affinity, are poorly functional but prone to inducing immunopathology [25]. Thus, cross-reactive memory T cells are present in increased numbers and have a low activation threshold. They may outcompete their naive subsets that have high affinity for secondary-infected serotype with an overall detrimental outcome for protective immunity [25]. Collectively, studies showed that dengue infection elicits a broad specific T cell response that peaks around day 8–10 from fever onset [24, 26]. Dengue-specific CD8⁺ T cells are present at higher frequencies compared to their CD4⁺ counterparts and preferentially target non-structural proteins NS3, NS4B, and NS5, while CD4⁺ T cells are mainly directed toward the capsid envelope and the secreted protein NS1 [27]. A comparison of amino acid sequences of DENV and ZIKV CD8⁺ T cell epitopes point out a high sequence homology between the two viruses and suggests that some of these CD8⁺ epitopes may also exist in ZIKV [24].

Therefore, we evaluated a cohort of well-characterized DENV, ZIKV, or DENV/ZIKV-infected patients and DENV-exposed healthy donors. Molecular and serological methodologies confirmed all infections. Even without specific *in vitro* antigenic stimulation, DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV infections induced expression of CCR5, CX3CR1, and CXCR3 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, indicating an activated status of these cells. However, DENV/ZIKV coinfection decreased the ability of CD4⁺ T cells to produce IFN γ ⁺, TNF⁺, TNF⁺ IFN γ ⁺, and TNF⁺ IL2⁺, compared to DENV and ZIKV infections. Finally, a hyporesponsiveness of effector/memory T cells in most of acute patients against DENV NS1 specific antigen might occur due to a clonal exhaustion. We would like to emphasize the potential impact of coinfection on the immune response from a human host.

Materials and Methods

Ethics statement

Human blood samples were obtained after written informed consent from all participants. The study was conducted in accordance to the project approved by the Ethics Committee of Plataforma Brasil, FIOCRUZ (CAAE 13318113.7.0000.5248).

Human blood samples

Blood samples from dengue-exposed individuals were obtained from discarded routine blood donations' buffy coats at Clementino Fraga Filho University Hospital (Brazil) during 2013. Because these samples were collected anonymously, they were exempt from informed consent. All four healthy adult donors were seronegative for DENV IgM, seropositive for DENV IgG, negative for RT-PCR ZIKV and with no clinical history of infections in the past 3 months, suggesting that donors had experienced at least one DENV infections prior to blood donation. Patients' blood samples were collected between February and March 2016 in ACD Vacutainer and dry tubes. Physicians at Walfrido Arruda Emergency Care Unit, Coronel Antonino (Mato Grosso do Sul, Brazil) evaluated clinical parameters and classified all infected patients according to WHO, 2009 [18]. All samples were screened for DENV, ZIKV, and CHIKV as a differential diagnosis.

Diagnosis

Serum samples were used for all diagnostic tests described below. For diagnosis of suspect dengue cases, DENV IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, CA, USA) and Platelia™ Dengue NS1 Ag ELISA (BioRad Laboratories, CA, USA) were performed. Molecular detection and serotype typing were performed as previously described [28], by real-time RT-PCR protocol [29] and Simplexa™ Dengue Real Time RT-PCR (Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA) according to manufacturer's protocol. We considered a positive diagnosis for DENV the samples positive for DENV qRT-PCR or/and Dengue NS1 Ag, as stated above. Dengue patients were considered with primary infection provided being positive for IgM, whether negative for IgG or positive for IgG, provided the rate IgM/IgG was greater than 2.0. Dengue cases considered secondary infection presented IgM/IgG rate less than 2.0 [18]. We considered a positive diagnosis for Zika the samples positive for real-time RT-PCR for ZIKV, as described previously [19]. DENV/ZIKV coinfecting patients presented both criteria mentioned above for DENV and Zika positivity. For diagnosis of the suspected chikungunya cases, it was performed anti-CHIKV IgM capture ELISA described by CDC [30] and Brazilian Ministry of Health [31], anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Germany) and molecular RT-PCR protocol for CHIKV as described previously [32]. Patient details are provided in Table 1.

Reagents, proteins, and monoclonal antibodies

A mammalian recombinant DENV Non-Structural-1 (DENV NS1) from all four serotypes was used as stimuli

for ELISPOT. This protein was donated by The Native Antigen Company (https://thenativeantigencompany.com/product/dengue-virus-ns1-protein-serotypes-1-4/?doing_wp_cron=1480736436.0465950965881347656250). Phytohemagglutinin (PHA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin, Brefeldin A, and Saponin were supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Detailed information of all mAbs used in this study is listed in Table S1.

PBMC isolation and culture

Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma were isolated by Ficoll-Paque™ PLUS density gradient centrifugation (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and frozen in fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma–Aldrich). Cells were thawed on the day of the experiment and were used directly for *ex vivo* assay as follows.

Extracellular staining

Cells were stained for surface markers (FITC anti-CD3, APCy7 anti-CD4, AmCyan anti-CD8, PECy7 anti-CX3CR1, Pacific Blue anti-CCR5 and, PerCP anti-CXCR3) (Table S1) for 30 min, then washed, fixed with 2% paraformaldehyde, and maintained in PBS. The data were collected using BD[®] FACS ARIA IIu flow cytometer and analyzed using FlowJo 10 software (Tree Star[®]).

Intracellular staining (ICS)

For intracellular cytokine staining (ICS), PBMCs (2×10^5 cells/well) were incubated without stimuli or with PMA (10 ng/mL)/Ionomycin (1 µg/mL) for 2 h at 37°C. Then, Brefeldin A (10 µg/mL) was added to the cultures and incubated for 4 h. Cells were then washed and stained for extracellular markers for 30 min using BV510 anti-CD3, PECy7 anti-CD4, and PETexasRed anti-CD8. After that, cells were washed and fixed with 2% paraformaldehyde. For ICS, cells were blocked with bovine serum albumin (1% BSA, Sigma–Aldrich), permeabilized with saponin (0.05%) and stained with eFluor[®] 660 anti-IFN γ , Alexafluor[®] 700 anti-TNF, and eFluor[®] 450 anti-IL2 (Table S1). Samples were analyzed on BD[®] FACS ARIA IIu flow cytometer and analyzed using FlowJo 10 software (Tree Star[®]).

Ex vivo IFN γ ELISPOT assay

IFN γ enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) were performed using DENV-exposed donors' or acute patients' thawed PBMCs that were immediately added to ELISPOT plates. Briefly, 96-well plates (Multiscreen HTS; Millipore,

Table 1. Characteristics of the patient's cohort used for this study.

Patient code	Age (yr)	Gender	Type of infection ^a	Days of disease ^b	Severe DENV (WS/NWS) ^c	qRT-PCR DENV	NS1 DENV	IgM DENV	IgM CHIKV	qRT-PCR ZIKV	Platelets/mm ³	Leukocytes/mm ³	Lymphocytes/mm ³
DENV													
1	39	Male	Secondary	4	No (NWS)	DENV-1	pos	neg	neg	neg	248	4400	2464
2	47	Female	Secondary	22	No (WS)	DENV-1 ^d	neg	pos	neg	neg	117	—	—
3	69	Male	Secondary	3	No (WS)	DENV-1	pos	pos	neg	neg	98	2200	—
4	27	Female	Secondary	2	No (NWS)	DENV-4	neg	neg	neg	neg	209	7800	1248
5	52	Female	Primary	3	No (NWS)	DENV-1	pos	neg	neg	neg	163	3400	272
6	30	Female	Secondary	6	No (NWS)	neg	pos	pos	neg	neg	172	2700	575
Median [IQR]	43 [29–56]			4 [3–10]							168 [112–219]	3400 [2450–6100]	912 [348–2160]
ZIKV													
7	38	Female	Secondary	5		neg	neg	neg	neg	pos	197	3900	1521
8	28	Male	Primary	4		neg	neg	neg	neg	pos	128	3800	1330
9	45	Male	Secondary	3		neg	neg	neg	neg	pos	246	4000	1640
10	60	Female	Secondary	4		neg	neg	neg	neg	pos	289	6100	3416
Median [IQR]	42 [31–56]			4 [3–5]							222 [145–278]	3950 [3825–5575]	1581 [1378–2972]
DENV/ZIKV													
11	14	Male	Primary	2	No (NWS)	neg	pos	neg	neg	pos	260	4600	2024
12	46	Male	Secondary	5	No (NWS)	neg	pos	neg	neg	pos	151	5300	2120
13	19	Female	Secondary	8	No (NWS)	DENV-1	inconcl	neg	neg	pos	296	9900	2871
14	33	Female	Secondary	8	No (NWS)	DENV-1	neg	neg	neg	pos	239	6600	1848
15	21	Female	Secondary	4	No (NWS)	DENV-1	neg	neg	neg	pos	137	4700	2585
16	48	Male	Primary	3	No (NWS)	DENV-4	pos	neg	neg	pos	147	3000	870
17	18	Male	Secondary	2	No (NWS)	DENV-1	neg	pos	neg	pos	308	6000	780
Median [IQR]	21 [18–46]			4 [2–8]							239 [147–296]	5300 [4600–6600]	2024 [870–2585]

— Data not available.

^aPerformed by the IgG DENV.

^bDays after the initial symptoms.

^cWS/NWS, dengue fever with warning signs/dengue fever without warning signs.

^dPatient 2 confirmed DENV-1 infection using SimplexTM Dengue Real Time RT-PCR (Focus Diagnostics, Cypress, CA) (CT = 34) even after 22 days of onset of symptoms.

Burlington, MA, USA) were coated overnight at 4°C with 2.5 µg/mL of capture mouse anti-human IFN γ antibody (clone 1-DK1; Mabtech, Nacka Strand, Sweden). The plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and blocked with RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Co) supplemented with 10% heat-inactivated FBS for 1 h at room temperature. Blocking solution was removed, and 2×10^5 PBMCs were plated per well in the presence or absence of NS1 protein from all four DENV serotypes at a concentration of 0.1 µg/mL. After 20–24 h of incubation plates were washed and 1 µg/mL of biotinylated anti-human IFN γ (clone 7-B6-1; Mabtech) was added for 2 h at room temperature. After washing, 100 µL of streptavidin-alkaline phosphatase (Mabtech) was added and the plates were incubated in the dark for 1 h at room temperature. Then, plates were washed, and 50 µL of alkaline-phosphatase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP-NBT); KPL (Gaithersburg, MD, USA) was added. After 10–15 min, colorimetric reaction was stopped with running tap water. Spots were counted using an automated ELISPOT reader (ImmunoSpot[®] S6UV Ultra, Cleveland, OH, USA). The number of IFN γ -producing cells was expressed as spot-forming cells (SFC) relative to 10^6 PBMCs. Values were calculated by subtracting the number of spots detected in unstimulated control wells. Values were considered positive if they were equal or greater than 10 spots and at least two times above the mean of unstimulated control wells. As a positive control, cells were stimulated with phytohemagglutinin (PHA at 5 µg/mL).

Statistics

ELISPOT and chemokines receptors analysis were determined using nonparametric two-tailed Mann–Whitney (Graph Pad Prism ver. 5.0). Multifunctional analysis of cytokine frequencies was performed using Boolean gating in FlowJoX ver. 10.3 and GraphPad Prism ver. 6.0. To compare the frequency of the multifunctional populations among the groups Mann–Whitney test was used. The differences of variables among groups were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Characteristics of patient's cohort

Peripheral venous blood was obtained from 4 DENV-acute patients and 1 late-acute phase disease (with 22 days' illness), 4 ZIKV-acute patients and, 7 DENV/ZIKV coinfecting acute patients. As shown in Table 1, patient 2 confirmed DENV-1 infection using Simplex[™] Dengue Real Time RT-PCR (Ct, Cycle threshold value = 34.6) even after 22 days of onset of symptoms. All four matched healthy donors were negative for DENV IgM, positive for DENV IgG, and negative for RT-PCR

ZIKV, so they were referred here as DENV-exposed donors. Thirteen patients (76.5%) had dengue during their lifetime, presumed by the positivity for DENV IgG, in which 5 individuals were from DENV group, 3 from ZIKV, and 5 from DENV/ZIKV coinfection group. Most of DENV- or DENV/ZIKV patients showed a mild clinical form (non-warning signals or NWS) and no fatal cases were observed among the cohort studied. In general, symptoms and signs caused by these viruses were similar among the studied groups, and the patients presented typical symptoms such as fever, rash, arthralgia, myalgia, fatigue, headache, and conjunctival hyperemia. No differences were observed in age, gender distribution or days of disease comparing all groups. Similarly, no differences were seen for platelets, leukocytes, and lymphocytes counts among groups. The serotype DENV-1 was predominant among DENV- or DENV/ZIKV-coinfecting patients (80%). Finally, all studied samples were also negative for CHIKV diagnosis. The characteristics of all acute patients are detailed in Table 1.

DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV infection induce an increase of T CD4⁺ and CD8⁺ chemokine expression

Chemokines and their receptors are key drivers of inflammation. Our goal here was to assess the magnitude of T cell activation by ex vivo expression of chemokine receptors, particularly useful for dissecting T-cell subsets with distinct migratory capacity and effector function. As shown in Figure 1, expression of ex vivo chemokine receptors such as CCR5, CX3CR1, and CXCR3 were consistently detected on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from all acute patients and healthy exposed donors. DENV/ZIKV infected individuals presented higher frequencies of CCR5⁺ or CX3CR1⁺ compared to exposed donors. Although not significant ($p = 0.0571$), we observed that DENV or ZIKV infected individuals have a propensity to have high CX3CR1⁺ frequencies compared to exposed individuals. (Fig. 1b,c). No appreciable differences were detected in CXCR3 expression on CD4⁺ T cells among all groups (Fig. 1d). Intriguingly, among patients analyzed in DENV group, the lowest values for all chemokine receptors expression on CD4⁺ T cells were observed for patient 2, in which cells were obtained 22 days post infection, even though viral genome was still detected.

CCR5, CX3CR1, and CXCR3 were detected in higher numbers of circulating CD8⁺ T cells in all three groups of infected patients in comparison to those exposed donors (Fig. 1f–h).

Therefore, regardless of acute viral infection, CD4⁺ and CD8⁺ T cells would be readily able to migrate and perform effector function.

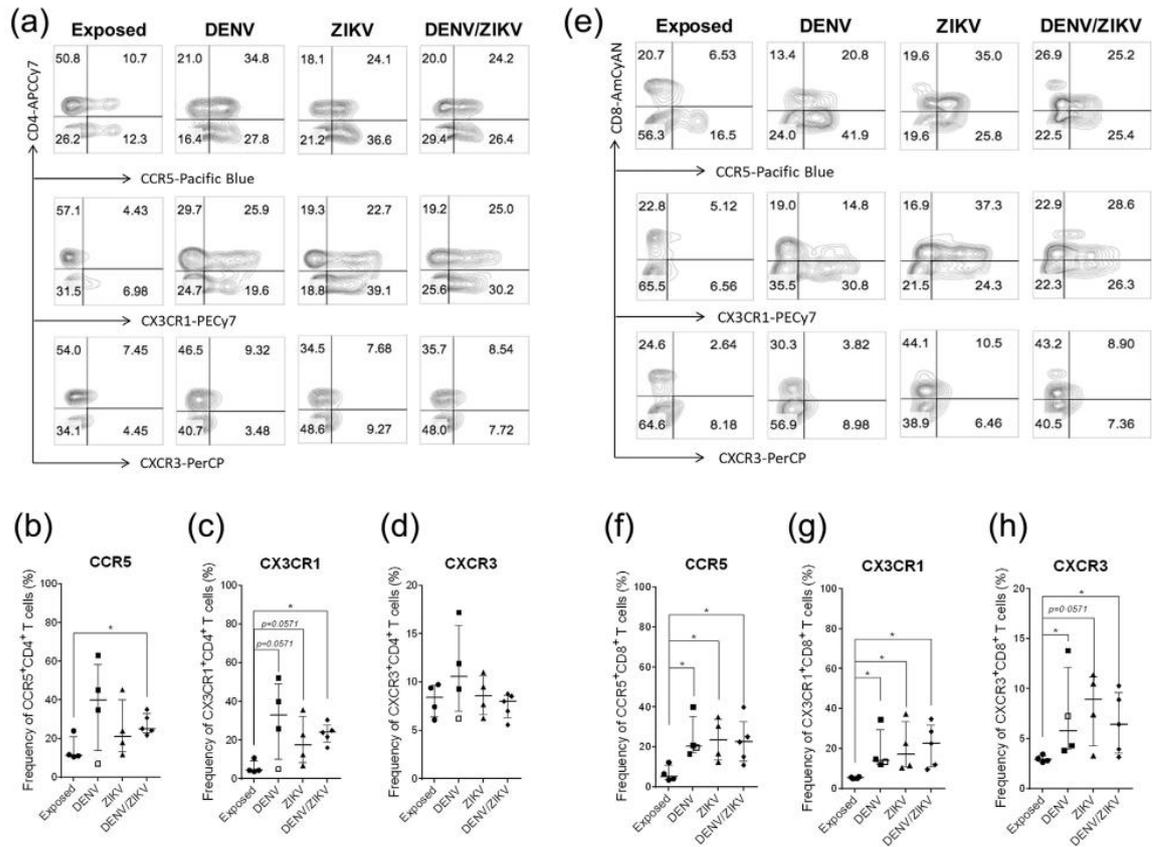


Figure 1. Chemokine receptor expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations in acute DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV patients. Peripheral blood mononuclear cells (2×10^5) were stained with mAb against surface markers CD3, CD8, CD4, CCR5, CX3CR1, and CXCR3. The expression of CCR5, CX3CR1, and CXCR3 on CD4⁺ (a) and CD8⁺ T cells (e) was shown in contour plots from one representative exposed donor, DENV-, ZIKV-, and DENV/ZIKV-patients by flow cytometry. Frequency, median, 25th and 75th percentile of CCR5⁺ (b), CX3CR1⁺ (c), and CXCR3⁺ (d) CD4⁺ T cells from acute viral patients were compared between them and with those in exposed healthy controls. The same strategy was used for CD8⁺ T cells (f–h). Patient 2 in late acute phase (22 days of illness) was shown as open squares. Statistical significance of differences between groups was determined by using two-tailed Mann–Whitney test, where $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Frequency of cytokine-producing T CD4⁺ and CD8⁺ are differentially regulated in DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV infection.

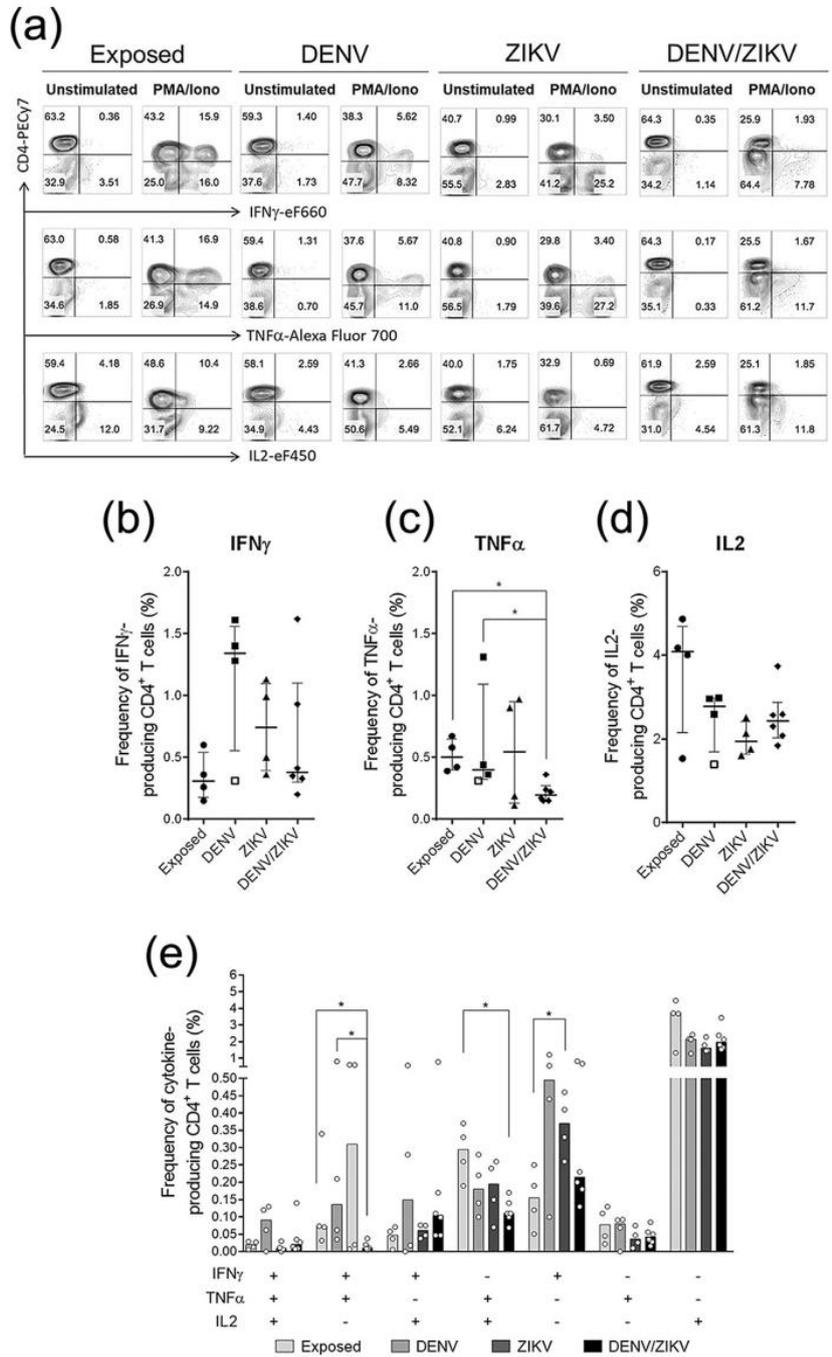
To assess the effector function of T cells by means of cytokine produced, we also evaluated the frequency of cells spontaneously producing TNF, IL2, and IFN γ .

As shown in Figure 2, even without antigenic in vitro stimulation, we observed low, but detectable, frequencies of IFN γ ⁺ (0.1–1.6%, minimum to maximum), TNF⁺ (0.06–1.3%) and IL2⁺ (0.3–1.8%) producing T cells from acute patients and in healthy DENV-exposed donors' T cells (IFN γ , 0.1–0.6%; TNF, 0.1–0.7%; IL2, 0.5–4.9%).

Initially, we evaluated separately the frequency of IFN γ , TNF, IL2 producer CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, regardless of their simultaneous production (Fig. 2b–d, g–i). First, we observed a trend toward an

increased frequency of total IFN γ ⁺CD4⁺ T cells in DENV (exception of patient 2, open squares) compared to exposed donors. DENV/ZIKV-patients and exposed healthy donors had similar frequencies of total IFN γ ⁺CD4⁺ T cells (Fig. 2b). Exposed donors, DENV- and ZIKV-patients had a similar frequency of total TNF⁺CD4⁺ T cells, while DENV/ZIKV-patients had significantly decreased frequencies of total TNF⁺CD4⁺ T cells compared to exposed donors and DENV-patients (Fig. 2c). A trend toward decreased frequencies of total IL2⁺CD4⁺ T cells was seen in all acute patients compared to exposed donors (Fig. 2d).

Then, we evaluated the fractions of each multifunctional cell population expressing all three, any combination of two or single production of cytokines (Fig. 2e and j). Among T CD4⁺ lymphocytes, the least prevalent populations with two



functions were IFN γ^+ TNF $^+$ and IL2 $^+$ TNF $^+$ in DENV/ZIKV-patients compared to exposed donors. Higher frequency of IFN γ^+ TNF $^+$ CD4 $^+$ T cells was observed in DENV- compared to DENV/ZIKV-patients. Finally, we observed increased

frequency of single IFN γ^+ CD4 $^+$ T cell population in ZIKV-patients compared to exposed donors (Fig. 2e).

A similar analysis was applied to CD8 $^+$ T cells. We detected a significant increase in total IFN γ^+ CD8 $^+$ T cells frequency in

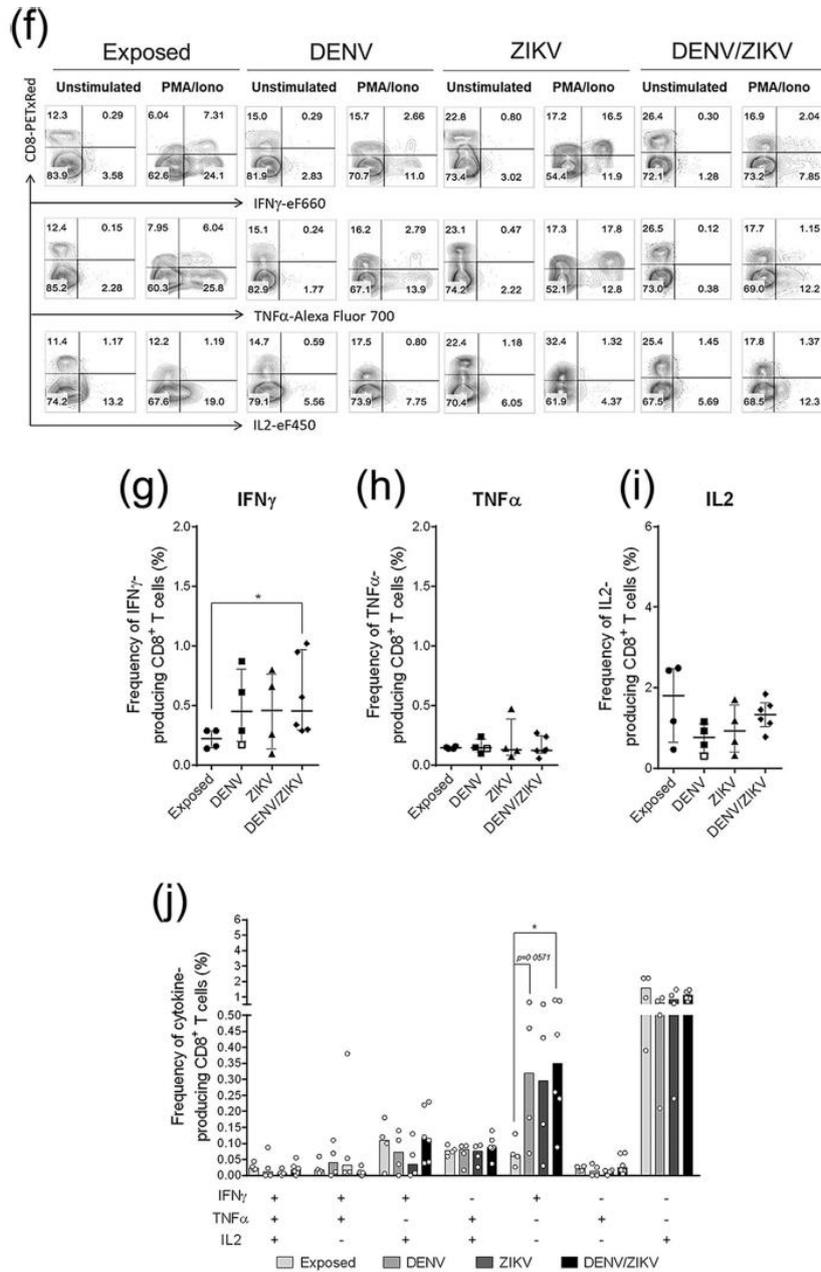


Figure 2. Frequency of IFN γ -, TNF-, and IL2-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV-patients and exposed donors. Cultures of 2×10^5 PBMCs were stimulated with PMA/Ionomycin or unstimulated (medium) for 6 h in presence of brefeldin in the last 4 h. Then, cells were stained with mAb against surface markers CD3, CD8, CD4, and mAb against intracellular IFN γ , TNF, and IL2. Frequency of IFN γ , TNF, and IL2 on CD4⁺ (a) and CD8⁺ T cells (f) was exhibited in counter plots from one representative exposed donor, DENV-, ZIKV, and DENV/ZIKV-patients by flow cytometry for both conditions. Frequency, median, 25th and 75th percentile of IFN γ (b), TNF α (c), and IL2⁺ (d) CD4⁺ T cells in unstimulated condition from acute viral patients were compared between them and with those in exposed healthy controls. The same strategy was used (g-i). Patient 2 in late-acute phase (22 days of illness) was shown as open squares. Bars represent the median of frequency of CD4⁺ T cells (e) and CD8⁺ T cells (j) expressing each of the seven possible combinations of IFN γ , TNF, and IL2 among the studied groups in unstimulated condition. Statistical significance of differences between groups and comparisons among the multifunctional populations were determined by using two-tailed Mann-Whitney test and represented by lines. Values of $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

DENV/ZIKV-patients compared to exposed healthy donors. A trend toward increased frequency of total $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ T cells was observed in ZIKV and in DENV patients (except for patient 2, open squares) (Fig. 2g). Exposed donors, DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV-patients had similar frequency of total $\text{TNF}^+\text{CD8}^+$ T cells (Fig. 2h). A decreased frequency trend of total $\text{IL2}^+\text{CD8}^+$ T cells, similarly to total $\text{IL2}^+\text{CD4}^+$ T cells, was detected in all acute patients compared to exposed donors (Fig. 2i). Regarding the multifunctional analysis, we only detected a higher frequency of single $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ T cells in DENV- and DENV/ZIKV-patients compared to exposed donors (Fig. 2e). Therefore, we suggest that DENV/ZIKV coinfection may influence differently CD4^+ and CD8^+ T cells responses, an effect mainly observed in the frequencies of $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}^+$, $\text{CD4}^+\text{TNF}^+\text{IL2}^+$, and CD8^+ total $\text{IFN}\gamma^+$ populations.

DENV-specific response targeting NS1 proteins was rarely detectable in acute patients

We used DENV NS1 protein to evaluate DENV-specific response in acute patients because ZIKV and DENV NS1 share 53–56% of amino acid identity [33]. Moreover, NS1 has gained considerable attention for early dengue diagnostic tests. All healthy donors and 75% of acute patients in our cohort had indications of previous dengue, thus it was expected that they would be great responders of NS1 DENV. Considering this, we assessed DENV-specific T cell response against a pool of NS1 from all four serotypes in PBMCs isolated from acute patients from DENV-exposed donors by $\text{IFN}\gamma$ ELISPOT assay (Fig. 3a).

Our initial objective was to compare NS1 DENV-specific memory response from dengue-exposed donors with dengue-infected individuals. Our data indicate that DENV

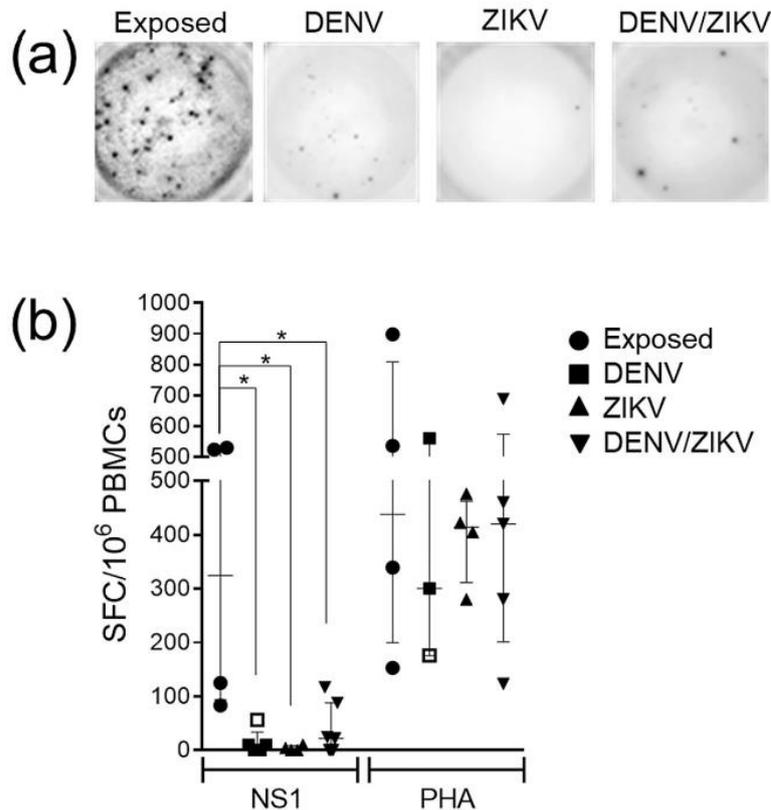


Figure 3. DENV-specific cells targeting DENV 1–4 NS1 protein in acute DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV-patients, and donors experiencing dengue. Peripheral blood mononuclear cells (2×10^5 in 0.1 mL) were incubated with recombinant mammalian (rm) NS1 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) derived from four different DENV serotypes or PHA for 20 h and $\text{IFN}\gamma$ production was measured by ELISPOT assay. (a) Representative $\text{IFN}\gamma$ production from one representative exposed donor, DENV, ZIKV, and DENV/ZIKV-patients are shown against rmNS1. (b) The values obtained of $\text{IFN}\gamma$ production, expressed as spot-forming cells (SFC) relative to 10^6 PBMC, is shown for the rmNS1 and PHA were compared between them and with those in exposed healthy controls. Graphs show the median, 25th and 75th percentile from acute-patients and DENV-exposed ZIKV naïve donors. Statistical significance was determined by using the two-tailed Mann–Whitney test, where $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

NS1 memory response had the highest frequencies and magnitude in healthy dengue-exposed donors compared to those with active DENV infection. Among DENV single-infected patients, the 22-days DENV patient 2 showed the best response to NS1, indicating that latter phases of dengue could be a better time point for evaluating specific cell responses through ELISPOT. Our second goal was to determine whether active ZIKV infection could affect the NS1 DENV-specific memory response in two different situations: in DENV-exposed patients or in those who have current ZIKV or DENV/ZIKV infections. Our data showed that DENV NS1 was not able to induce a response in any acute active ZIKV-patients, even the samples being positive for Dengue IgG ELISA test. Two out five DENV/ZIKV-patients responded with above 50 IFN γ SFC following DENV NS1 stimulation, while the other three responded with below 20 IFN γ SFC after stimulation (Fig. 3b). Finally, the magnitude of IFN γ SFC response was not statistically different among the groups of acute patients. In order to understand the specificity of this response, we intend to evaluate healthy donors exposed to Zika in the future.

Discussion

Although T lymphocytes are not infected by DENV and appear not to be infected by ZIKV [34], the impact of each one and of the DENV/ZIKV coinfection seem to affect their function. To address this investigation, we attempted to analyze some features of CD4⁺ and CD8⁺ T cell response in PBMC from patients in a cohort of DENV only, ZIKV only and DENV/ZIKV coinfecting patients. Our work began with extensive fieldwork in the Midwest region of Brazil in 2016. There, 134 suspected cases of dengue or zika with an acute febrile illness were recruited, including those with by at least two of the signs and symptoms (headache, myalgia or arthralgia, rash, pruritus, retro-orbital pain, and prostration). Methods of serology and molecular biology have been designed to diagnose the etiologic agent. Of the suspected cases, 6% of them confirmed ZIKV alone, 50% DENV, 22% were coinfecting DENV/ZIKV, the others chikungunya, coinfections or not confirmed cases. At this point we realize that we did not have a larger number of samples with zika alone (Azeredo *et al.* data in submission). Therefore, we analyzed small numbers of individuals in each studied group to match ZIKV-infected patients' number, even though aware of the possible impact on dispersion of variables such as age, gender, and others because of a reduced number of donors. Despite that, we could report for the first time some aspects of DENV/ZIKV coinfection and compare then to DENV and ZIKV only infections, as well as healthy donors. Herein, our data reported from 17 well-characterized patients infected by DENV, ZIKV or DENV/ZIKV and 4 healthy donors.

Our research evaluated the expression of chemokine receptors on T cells. Chemokine receptors have been useful for dissecting T-cell subsets with distinct migratory capacity and effector function [35]. We assessed the effector as well as memory T cells by an increased expression of CCR5, CX3CR1, or CXCR3, in contrast to their T naïve precursors. CCR5 and CXCR3 are closely linked to Th1 function on activated CD4⁺, memory/activated CD8⁺ T cells, and NK cells [36–38]. Our data confirmed an increased expression of CCR5 on T cells from acute dengue patients [39, 40]. CCR5 expression would be promoting an enhanced T cell recruitment into the liver, a hypothesis that was corroborated by a high frequency of CCL5⁺ cells in hepatic tissue from dengue fatal cases [40]. It is widely accepted that CCR5 is part of host's immune response in the dengue, its role, mediating the traffic of immune cells from blood to target tissues or acting directly on the antiviral response, is still unknown. A recent study demonstrated CX3CR1-based transcriptome and proteome-profiling defined a core signature of memory CD8⁺ T cells with cytotoxic effector function [41]. Highly polarized CX3CR1⁺ cytotoxic CD4⁺ T cells was specifically expanded in exposed donors and, in particular, in those donors carrying an HLA allele associated with protection from severe dengue [42]. By the fact that an increased frequency of CD4 and CD8 T cells expressing CX3CR1 in patients with DENV and, for the first time, in patients with ZIKV and DENV/ZIKV, our data could indicate a potential cytotoxic capacity of T cells from these in acute patients. The protective role of CXCR3 against DENV infection has been demonstrated in experimental models since CXCR3^{-/-} mice infected by DENV presented a higher mortality rates than the wild-type mice. Moreover, brains of CXCR3^{-/-} mice showed higher viral loads and quantitatively fewer CD8⁺ T cells than those of wild-type mice [43]. We hypothesize that an increase in the frequency CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing chemokine receptors would contribute to regulate virus progression through a precise control of inflammatory cells targeting the affected tissue. Thus, chemokine receptors would play a more immunoprotective role once T cells could exert an antiviral, effector, cytotoxic, and migratory activities.

The frequency of IFN γ -producing T cells has been the most used parameter to assess an effective immune or vaccine-induced response. Similarly to IFN γ , TNF is capable of mediating the killing of a variety of intracellular infectious viruses, bacteria, and parasites [44, 45]. Although IL2 has little direct effector function, it promotes the expansion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, amplifying any potential effector T cell responses. Importantly, it has been demonstrated that frequency of cytokine-producing T cells alone is not sufficient to predict protection. To provide prospective evidence of the quality of T cell response, vis-à-vis multifunctional T cells is required [23]. Regarding dengue, compelling evidence of the importance of multifunctional

T-cells to mediate protection was found in Flavivirus-naïve volunteers vaccinated with live, attenuated DENV-1 vaccine, rDEN1Δ30. The authors observed that multifunctional T cells increased significantly in non-viremic subjects tended to have a higher frequency of multifunctional T cells compared to viremic subjects. Therefore, the presence of multifunctional T cells following rDEN1Δ30 vaccine safely and effectively prompt immune responses associated with control of infection and protection from re-infection [46].

Finally, we studied the magnitude of IFN γ response to DENV NS1. Gideon's team did not observe differences in IFN γ induction between peptide pools and recombinant proteins in overnight ELISPOT assay using PBMC from the same donors [47]. A higher magnitude of IFN γ response to DENV NS1 was found in experienced dengue donors, but a hyporesponsiveness was found in any acute viruses, even experiencing dengue. In 2001, our group described a reduced frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and a poor ability for T-lymphocyte proliferation in response to mitogens and dengue antigens in acute DENV-infected patients, but re-established in convalescence phase [48]. Another study found that in vitro exposure to DENV-2 of T lymphocytes isolated from healthy donors reduces the lymphoproliferative capacity in response to mitogen, suggesting that DENV-2 can inhibit T cell-mediated immunity, bypassing monocytes and dendritic cells, classical DENV cell targets [49].

Briefly, mono- and coinfections similarly induced expression of CCR5, CX3CR1, and CXCR3 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. This could promote functional and migratory similarities of these cells, regardless of the infecting virus. However, DENV/ZIKV coinfection decreased the ability of CD4⁺ T cells to produce IFN γ ⁺, TNF⁺, TNF⁺IFN γ ⁺, and TNF⁺IL2⁺, compared to mono-infections. We suppose two antagonistic scenarios: coinfecting people are more immunocompromised than those mono-infected, so coinfection would be the worst scenario for those individuals. Another example of potential adverse effects of this immunosuppression is, that a reduced capacity to activate CD4⁺IFN γ ⁺TNF⁺ and CD4⁺TNF⁺IL2⁺ T cell populations might interfere with future development of specific or cross-reactive memory lymphocytes, leading to a weak response in a subsequent encounter to other potential arbovirus. In the other scenario, coinfecting people have a less inflammatory milieu than mono-infected people. This could mean that a reduced inflammatory condition could avoid harmful effects like cytokine storm. Nevertheless, once the clinical outcome of the patients was similar, it was not possible to associate the symptoms and clinical signs with the immune profile of each group.

Acknowledgments

We would like to thank the Flow Cytometry and cell sorting core RPT08A and ELISPOT Platform (PDTIS/FIOCRUZ)

for antibody and acquisition support. We gratefully thank the voluntary participation in this study of healthy individuals at the Clementino Fraga Filho University Hospital (Rio de Janeiro, Brazil) and patients from Walfrido Arruda Emergency Care Unit, Coronel Antonino (Mato Grosso do Sul, Brazil). Also, we thank to Physicians at the Walfrido Arruda Emergency Care Unit, Coronel Antonino evaluated clinical parameters and classified all infected-patients according to WHO and Brazilian Ministry of Health. This work was financially supported by IOC/FIOCRUZ and FAPERJ. Juan Camilo Sánchez-Arcila is recipient of Post-doctoral fellowship FAPERJ E-26/202.011/2016.

Authors' Contributions

JBCdS, JCSA, ELdA, and LMdOP performed experiments, reviewed data, and planned the experimental strategy. MG collected data using a FACS ARIA BD flow cytometer. ABdP, JBCdS, TMAAdSEP, LBdS, PCGN, and MdRQL performed all diagnostic tests. RVdC, JBCdS, TMAAdS, LBdS, and ELdA collected samples and provided clinical information. JBCdS, JCSA, and LMdOP conceived and directed the study, and wrote the manuscript. All authors have critically read and edited the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Lazear, H. M., and M. S. Diamond. 2016. Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the western hemisphere. *J. Virol.* 90:4864–4875.
2. Kuno, G., and C. G-JJ. 2007. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 152:687–696.
3. Guzmán, M. G., and G. Kourí. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2:33–42.
4. Haddow, A. D., A. J. Schuh, C. Y. Yasuda, M. R. Kasper, V. Heang, R. Huy, H. Guzman, R. B. Tesh, and S. C. Weaver. 2012. Genetic characterization of zika virus strains: geographic expansion of the asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1477.
5. WHO. Dengue Fact Sheet. http://www.searo.who.int/vector_borne_tropical_diseases/data/data_factsheet/en/ (2017, accessed 24 February 2017).
6. Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504–507.

7. Rodrigues, N. C. P., V. T. S. Lino, R. P. Dumas, M. K. de N. Andrade, G. O'Dwyer, D. L. M. Monteiro, A. Gerardi, G. H. B. V. Fernandes, J. A. S. Ramos, C. E. G. Ferreira, et al. Temporal and spatial evolution of dengue incidence in Brazil, 2001–2012. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165945>. [Epub ahead of print].
8. Aubry, M., J. Finke, A. Teissier, C. Roche, J. Broult, S. Paulous, P. Desprès, V.-M. Cao-Lormeau, and D. Musso. 2015. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 41:11–12.
9. Cao-Lormeau, V.-M., and D. Musso. 2014. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet* 384:1571–1572.
10. Duffy, M. R., T.-H. Chen, W. T. Hancock, A. M. Powers, J. L. Kool, R. S. Lanciotti, M. Pretrick, M. Marfel, S. Holzbauer, C. Dubray, et al. 2009. Zika virus outbreak on yap island, federated states of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360: 2536–2543.
11. Campos, G. S., A. C. Bandeira, and S. I. Sardi. 2015. Zika virus outbreak, bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21:1885–1886.
12. Lednicky, J., V. M. Beau De Rochars, M. El Badry, J. Loeb, T. Telisma, S. Chavannes, G. Anilis, E. Cella, M. Ciccozzi, M. Rashid, et al. 2016. Zika virus outbreak in Haiti in 2014: molecular and clinical data. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: e0004687.
13. Zanluca, C., V. C. A. Melo, A. L. P. Mosimann, G. I. V. D. Santos, C. N. D. D. Santos, and K. Luz. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110:569–572.
14. Pierson, T. C., and B. S. Graham. 2016. Zika virus: immunity and vaccine development. *Cell* 167:625–631.
15. Metsky, H. C., C. B. Matranga, S. Wohl, S. F. Schaffner, C. A. Freije, S. M. Winnicki, K. West, J. Qu, M. L. Baniecki, A. Gladden-Young, et al. 2017. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* 546:411–415.
16. Azevedo, R. S. S., M. T. Araujo, A. J. Martins Filho, C. S. Oliveira, B. T. D. Nunes, A. C. R. Cruz, A. G. P. A. C. Nascimento, R. C. Medeiros, C. A. M. Caldas, F. C. Araujo, et al. 2016. Zika virus epidemic in Brazil. I. Fatal disease in adults: clinical and laboratorial aspects. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan. Am. Soc. Clin. Virol.* 85:56–64.
17. Brito, C. 2015. Zika virus: a new chapter in the history of medicine. *Acta Med. Port.* 28:679–680.
18. WHO and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. <http://www.who.int/tpc/guidelines/9789241547871/en/>. (2009, accessed 13 February 2017).
19. Lanciotti, R. S., O. L. Kosoy, J. J. Laven, J. O. Velez, A. J. Lambert, A. J. Johnson, S. M. Stanfield, and M. R. Duffy. 2008. Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, yap state, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1232–1239.
20. Cao-Lormeau, V.-M., A. Blake, S. Mons, S. Lastère, C. Roche, J. Vanhomwegen, T. Dub, L. Baudouin, A. Teissier, P. Larre, et al. 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet Lond. Engl.* 387:1531–1539.
21. Johansson, M. A., L. Mier-y-Teran-Romero, J. Reefhuis, S. M. Gilboa, and S. L. Hills. 2016. Zika and the risk of microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 375:1–4.
22. Kleber de Oliveira, W., J. Cortez-Escalante, W. T. G. H. De Oliveira, G. M. I. do Carmo, C. M. P. Henriques, G. E. Coelho, and G. V. 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. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65:242–247.
23. Seder, R. A., P. A. Darrah, and M. Roederer. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 8:247–258.
24. Rivino, L. 2016. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* 15: 443–453.
25. Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai, X. Xu, S. Vasanawathana, N. Tangthawornchaikul, A. Chairunsri, S. Sawasdivorn, T. Duangchinda, T. Dong, S. Rowland-Jones, et al. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat. Med.* 9:921–927.
26. Simmons, C. P., T. Dong, N. V. Chau, N. T. P. Dung, T. N. B. Chau, L. T. T. Thao, N. T. Dung, T. T. Hien, S. Rowland-Jones, and J. Farrar. 2005. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J. Virol.* 79:5665–5675.
27. Rivino, L., A. T. Tan, A. Chia, E. A. P. Kumaran, G. M. Grotenbreg, P. A. MacAry, and A. Bertoletti. 2013. Defining CD8+ T cell determinants during human viral infection in populations of Asian ethnicity. *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 191:4010–4019.
28. Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang, and A. V. Vorndam. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:545–551.
29. Johnson, B. W., B. J. Russell, and R. S. Lanciotti. 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43:4977–4983.
30. CDC. Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories.
31. Ministério da Saúde (Brasil). Febre de Chikungunya manejo clínico. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_chikungunya_manejo_clinico.pdf. (2015).
32. Lanciotti, R. S., O. L. Kosoy, J. J. Laven, A. J. Panella, J. O. Velez, A. J. Lambert, and G. L. Campbell. 2007. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 13:764–767.

33. Song, H., J. Qi, J. Haywood, Y. Shi, and G. F. Gao. 2016. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23:456–458.
34. Foo, S.-S., W. Chen, Y. Chan, J. W. Bowman, L.-C. Chang, Y. Choi, J. S. Yoo, J. Ge, G. Cheng, A. Bonnin, et al. 2017. Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat. Microbiol.* 1.
35. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2009. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur. J. Immunol.* 39:2076–2082.
36. Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184:963–969.
37. Farber, J. M. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 61:246–257.
38. Gao, P., X.-Y. Zhou, Y. Yashiro-Ohtani, Y.-F. Yang, N. Sugimoto, S. Ono, T. Nakanishi, S. Obika, T. Imanishi, T. Egawa, et al. 2003. The unique target specificity of a nonpeptide chemokine receptor antagonist: selective blockade of two Th1 chemokine receptors CCR5 and CXCR3. *J. Leukoc. Biol.* 73:273–280.
39. Sierra, B., A. B. Perez, G. Garcia, E. Aguirre, M. Alvarez, D. Gonzalez, and M. G. Guzman. 2014. Role of CC chemokine receptor 1 and two of its ligands in human dengue infection. Three approaches under the Cuban situation. *Microbes Infect.* 16:40–50.
40. de-Oliveira-Pinto, L. M., C. F. Marinho, T. F. Pova, E. L. de Azeredo, L. A. de Souza, L. D. R. Barbosa, A. R. C. Motta-Castro, A. M. B. Alves, C. A. L. Ávila, L. J. de Souza, 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:e38527.
41. Böttcher, J. P., M. Beyer, F. Meissner, Z. Abdullah, J. Sander, B. Höchst, S. Eickhoff, J. C. Rieckmann, C. Russo, T. Bauer, et al. 2015. Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nat. Commun.* 6:8306.
42. Weiskopf, D., D. J. Bangs, J. Sidney, R. V. Kolla, A. D. De Silva, A. M. de Silva, S. Crotty, B. Peters, and A. Sette. 2015. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:E4256–E4263.
43. Hsieh, M.-F., S.-L. Lai, J.-P. Chen, J.-M. Sung, Y.-L. Lin, B. A. Wu-Hsieh, C. Gerard, A. Luster, and F. Liao. 2006. Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 177:1855–1863.
44. Sandberg, J. K., N. M. Fast, and D. F. Nixon. 2001. Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 167:181–187.
45. Lichterfeld, M., X. G. Yu, M. T. Waring, S. K. Mui, M. N. Johnston, D. Cohen, M. M. Addo, J. Zaunders, G. Alter, E. Pae, et al. 2004. HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 104:487–494.
46. Lindow, J. C., N. Borochoff-Porte, A. P. Durbin, S. S. Whitehead, K. A. Fimlaid, J. Y. Bunn, and B. D. Kirkpatrick. 2012. Primary vaccination with low dose live dengue 1 virus generates a proinflammatory, multifunctional T cell response in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1742.
47. Gideon, H. P., M. S. Hamilton, K. Wood, D. Pepper, T. Oni, R. Seldon, C. Banwell, P. R. Langford, R. J. Wilkinson, and K. A. Wilkinson. 2013. Impairment of IFN-gamma response to synthetic peptides of *Mycobacterium tuberculosis* in a 7-day whole blood assay. *PLoS One.* 8:e71351.
48. Azeredo, E. L., S. M. Zagne, M. A. Santiago, A. S. Gouvea, A. A. Santana, P. C. Neves-Souza, R. M. Nogueira, M. P. Miagostovich, and C. F. Kubelka. 2001. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 204:494–507.
49. Fuentes-Miranda, C. J., F. J. Sánchez-García, A. R. Coker, O. Rojas-Espinosa, R. Salinas-Tobón, and M. M. B. Moreno-Altamirano. 2014. Dengue virus serotype-2 impairs proliferation of healthy donors' T lymphocytes. *Intervirology* 57:83–92.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Table S1. Monoclonal antibodies used in this study.

Artigo 2: Badolato-Corrêa et al. (submetido).

Diferença na longevidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em uma coorte de mães e crianças com histórico de infecção por ZIKV

Semelhante a dengue, a infecção pelo ZIKV é caracterizada por uma doença autolimitada e com sintomas brandos. No entanto, quando a infecção ocorre durante a gravidez, o ZIKV pode atravessar a barreira transplacentária e afetar o desenvolvimento fetal. Como descrito na Introdução, parte destas crianças podem desenvolver um amplo espectro de malformações congênitas, que caracterizam a Síndrome Congênita do Zika (SCZ). Diante desse cenário, buscamos *avaliar a função efetora de linfócitos T de mães infectadas na gravidez e de filhos expostos ao vírus após 2-3 anos de exposição, frente à megapools de peptídeos do ZIKV.*

Iniciamos nosso estudo avaliando a expressão da molécula CD127 (ou cadeia α do receptor da IL-7), sabendo-se que IL-7 é uma das principais citocinas envolvidas na regulação e homeostasia de linfócitos T *naive* e de memória. Particularmente nos linfócitos T CD8⁺, uma alta expressão de CD127 (CD127^{high}) é associada à linfócitos T CD8⁺ antivirais dotados de alta capacidade proliferativa, mas de baixa citotoxicidade. Diferente da maioria dos linfócitos T CD4⁺ ativados e dos de memória que expressam fortemente CD127 (CD127^{high}), os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ regulatórias não expressam ou expressam fracamente CD127 (CD127^{neg/low}). Nossos resultados apontam para uma alta frequência de linfócitos T CD4⁺CD127^{low} comparada aos CD4⁺CD127^{high}, enquanto as frequências dos CD8⁺CD127^{high} e CD8⁺CD127^{low} foram semelhantes tanto nas mães como nas crianças. Continuamos as análises combinando a expressão de CD127, como marcador do *status* efetor/memória, com os marcadores de diferenciação das respostas Th1/Tc1, utilizando T-bet e Th2/Tc2, utilizando GATA-3. Nós demonstramos uma alta frequência de linfócitos T CD4⁺CD127^{high}T-bet^{neg}GATA-3⁺ nas mães e crianças. Ainda, uma alta frequência de linfócitos T CD8⁺CD127^{low}T-bet⁺GATA-3^{neg} seguida dos CD8⁺CD127^{high}T-bet^{neg}GATA-3⁺ nas mães e crianças.

Em seguida, iniciamos as avaliações da resposta de memória mediada por linfócitos T frente aos megapools de peptídeos específicos do ZIKV direcionados para linfócitos T CD4 e CD8. Pelo ensaio de ELISPOT, observamos um aumento da magnitude da resposta de IFN- γ (spot forming cells, SFC) ao megapool ZIKV direcionados aos linfócitos T CD4⁺ em mulheres-controles e mães, quando comparadas às crianças. Esse resultado foi confirmado pela análise de frequência dos respondedores. Em relação a magnitude da resposta de IFN- γ ao megapool ZIKV direcionados aos linfócitos T CD8⁺, os três grupos tiveram respostas similares, mas a frequência de respondedores indicou que as mulheres-controles foram mais responsivas quando comparadas às crianças.

Embora nosso estudo não tenha sido realizado em dias próximos a infecção pelo ZIKV, nós reagrupamos as mães de acordo com o desfecho clínico dos filhos, assim como os seus filhos, em assintomáticos e com SCZ. O intuito era avaliar se a resposta de memória de linfócitos T era diferente nestes subgrupos, uma vez que não podemos descartar a possibilidade de um *priming* de ativação diferente na fase aguda da infecção. Não observamos diferença em relação as crianças com SCZ comparadas às assintomáticas.

Atividade citotóxica é um componente chave na imunidade protetora contra às infecções virais. Por citometria de fluxo, buscamos avaliar se os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após estimulação *in vitro* com os megapools ZIKV apresentavam a capacidade de degranulação. A membrana dos grânulos citotóxicos contém a glicoproteína-1 associada à membrana lisossômica (LAMP-1 ou CD107a). A parte luminal do CD107a é transitoriamente exposta ao lado extracelular da membrana celular após a degranulação, antes de ser novamente internalizada. Portanto, a marcação extracelular de CD107a indica que ocorreu um evento de degranulação. Nossos dados demonstraram que a magnitude da resposta citotóxica dos linfócitos T CD4⁺, assim como a frequência de respondedores, foi detectada em 50% das mulheres-controles e em mais de 90% das mães e crianças. Por outro lado, a magnitude da resposta citotóxica dos linfócitos T CD8⁺, assim como a frequência de respondedores, foi baixa ou ausente em todos os grupos. Estes resultados também foram observados nos subgrupos de mães e crianças, nos quais ambos eram bastante respondedores aos megapools ZIKV direcionados aos linfócitos T CD4⁺, mas não aos

megapools ZIKV direcionados aos linfócitos T CD8⁺, independente do desfecho clínico.

O passo seguinte foi avaliar a produção de IFN- γ intracelular após estimulação *in vitro* com os megapools ZIKV por citometria de fluxo. Esta metodologia nos permitiu, além de identificar a subpopulação de linfócitos T produtores de citocina, avaliar também o estado de diferenciação (células naive, central de memória, efetora/efetora de memória e as efetoras de memória que reexpressam CD45RA) das células produtoras do IFN- γ . Nossos dados demonstraram que a magnitude da produção de IFN- γ dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, assim como a frequência de respondedores, foi detectada em parte das mulheres-controles, mães e crianças de forma similar. No entanto, a magnitude da resposta da produção de IFN- γ dos linfócitos T CD8⁺, assim como a frequência de respondedores, foi menor em relação aos linfócitos T CD4⁺ em todos os grupos. Em relação às crianças, não vimos diferença entre os subgrupos.

Os linfócitos T de memória em humanos são classicamente distinguidos pela expressão da isoforma CD45RO e pela falta de expressão da isoforma CD45RA. Em 1999, Sallusto e colaboradores, identificaram a heterogeneidade dos linfócitos T de memória no sangue periférico humano com base na expressão do CCR7. De acordo com os autores, os linfócitos T *naives* expressam uniformemente CCR7 (T_N) CD45RA⁺CCR7⁺, o que reflete sua residência predominante nos tecidos linfoides, enquanto os linfócitos T da memória são subdivididas em linfócitos T da memória central (T_{CM}) CD45RA⁻CCR7⁺, que trafegam para os tecidos linfoides e memória efetora (T_{EM}) CD45RA⁻CCR7⁻, que podem migrar para vários tecidos periféricos. Os autores também mostraram que os linfócitos T_{CM} produzem mais IL-2 do que os linfócitos T_{EM}, que por sua vez produzem mais citocinas efetoras. No entanto, linfócitos T_{CM} e T_{EM} produzem citocinas efetoras em resposta a vírus, antígenos e outros estímulos. Em 2000, o mesmo grupo definiu outro subconjunto de linfócitos T de memória, os linfócitos T de memória efetora reexpressando CD45RA (T_{EMRA}) CD45RA⁺CCR7⁻, que constituem linfócitos T mais relacionados à função citotóxica e co-estimulatória, em comparação com as T_{CM} e T_{EM}. Tendo em vista

todo esse conhecimento prévio, nós caracterizamos inicialmente as frequências de cada uma dessas subpopulações de linfócitos T nos três grupos. Em geral, observamos uma frequência alta de linfócitos T *naïves* CD4⁺ e CD8⁺ em comparação as demais subpopulações de linfócitos T de memória, em todos os grupos quando as células foram mantidas em cultura sem estimulação. Por fim, após estimulação *in vitro* com os megapools ZIKV CD4 e CD8, nós caracterizamos apenas as células produtoras de IFN- γ . De forma bastante interessante, demonstramos que os linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} eram as principais produtoras de IFN- γ .

1 **Differential Longevity of Memory CD4 and CD8 T cells in a**
2 **Cohort of the Mothers and Children with a History of ZIKV**
3 **Infection**

4
5 Jessica Badolato-Corrêa da Silva^{1*}, Fabiana Rabe Carvalho^{2*}, Iury
6 Amancio Paiva¹, Débora Familiar-Macedo¹, Monique da Rocha
7 Queiroz Lima¹, Mariana Gandini³, Andréa Alice Silva², Silvia Maria
8 Baeta Cavalcanti⁴, Solange Artimos de Oliveira⁵, Renata Artimos de
9 Oliveira Vianna⁵, Elzinandes Leal de Azeredo¹, Claudete Aparecida
10 Araújo Cardoso^{2,5}, Alba Grifoni⁶, Alessandro Sette^{6,7}, Daniela
11 Weiskopf⁶, Luzia Maria de-Oliveira-Pinto¹

12

13 ¹Immunology Lab, Fundação Oswaldo Cruz, RJ 21040-900, Brazil.

14 ²Multiuser Laboratory for Research in Nephrology and Medical Science, School
15 of Medicine, Universidade Federal Fluminense, RJ 24.033-900, Brazil

16 ³Laboratory of Cellular Microbiology, Fundação Oswaldo Cruz, RJ 21040-900,
17 Brazil.

18 ⁴Laboratory of Virological Diagnosis, Biomedical Institute, Universidade Federal
19 Fluminense, RJ 24.110-130, Brazil

20 ⁵Department of Maternal and Child, School of Medicine, Universidade Federal
21 Fluminense, RJ 24.033-900, Brazil

22 ⁶Center for Infectious Disease and Vaccine Research, La Jolla Institute for
23 Immunology (LJI), La Jolla, CA 92037, USA

24 ⁷Department of Medicine, Division of Infectious Diseases and Global Public
25 Health, University of California, San Diego (UCSD), La Jolla, CA 92037, USA

26 *These authors contributed equally.

27 Correspondence: lpinto@ioc.fiocruz.br

28 **Abstract**

29 Zika virus (ZIKV) infection are responsible for mild and self-limiting
30 disease in healthy adults. In newborns it can occasionally lead to a spectrum of
31 malformations, the congenital Zika syndrome (CZS). Little is known if mothers
32 and babies with a history of ZIKV infection were able to develop a long-lasting T-
33 cell immunity. To these issues, we measure the prevalence of ZIKV T-cell
34 immunity in a cohort of mothers infected to the ZIKV during pregnancy who gave
35 birth to infants affected by neurological complications or asymptomatic ones in
36 the 2016-2017 Zika outbreak. Twenty-one mothers and 18 children were tested
37 for IFN γ ELISpot and T-cell responses for flow cytometry assays in response to
38 ZIKV megapools (ZIKV MP). IFN γ ELISpot responses to ZIKV MP showed an
39 increased CD4 and CD8 T-cell responses in mothers compared to children. The
40 degranulation activity and IFN- γ -producing CD4 T cells were detected in most
41 women, mothers, and children, while low CD8 T-cell responses were detected.
42 Phenotypic analysis of the responding CD4 T cells for ZIKV CD4 MP revealed that
43 the IFN- γ + cells were mostly contained in the Temra memory T cell subsets. The
44 *imprint* of the ZIKV specific T cell responses in pregnant mothers infected with
45 ZIKV seems to be unrelated to their children's clinical outcome. Moreover,
46 donors with a history of ZIKV infection demonstrated lasting ZIKV specific CD4
47 T cell immunity, but not for CD8 T cell. The consequence of a short-lived
48 immunity of CD8 T cells for future ZIKV infections will be discussed.

49 **Keywords.** zika virus; T cell-mediated response; pregnancy; congenital
50 infection.

51

52 **Author Summary**

53 In pregnancy and congenital infection scenarios, it is not known if there is
54 a development of long-lasting T cell immunity to ZIKV. Here, we studied ZIKV
55 memory T cell responses from a cohort of mothers infected to the ZIKV during
56 pregnancy in the 2016-2017 Zika outbreak who gave birth infants affected by
57 neurological complications or asymptomatic ones. These donors were evaluated
58 in 2018-2019. Regarding the few current studies that raise the same questions,
59 our group has advanced when compared non-pregnant women and pregnant

60 mothers infected with ZIKV and children with a history of intrauterine exposure.
61 We show evidence that the responses of ZIKV-specific T cells in mothers appear
62 to be unrelated to their children's clinical outcomes. Regardless, if ZIKV infection
63 occurred during pregnancy or congenitally, all donors with a history of ZIKV
64 infection demonstrated lasting immunity to ZIKV-specific CD4 T cells after 2-3
65 years ago of the ZIKV infection, but not CD8 T cells. Future outbreaks of ZIKV
66 may clarify the consequence of short-lived immunity from CD8 T cells.

67

68 **Introduction**

69 The emergence of ZIKV in dengue-endemic regions creates a potentially
70 alarming scenario, as those caused by the ZIKV epidemic which spread across
71 countries, especially the Americas, during 2015–2016 [1, 2]. At present, half of
72 the world's population is considered at risk for DENV and cases of ZIKV continue
73 to be reported globally [3, 4].

74 DENV and ZIKV are member of the family *Flaviviridae* and are among the
75 several medically important viruses [5]. Both are spread via the bite of infected
76 mosquitoes, *Aedes spp.*, whose expanding ecological niches beyond the tropical
77 and sub-tropical regions [6]. Moreover, ZIKV can be transmitted via sexual
78 contact [7, 8], persists for weeks in the reproductive tract [9-11], and undergoes
79 vertical transmission from mother to fetus [12-15]. During Latin America and
80 French Polynesia outbreaks, ZIKV infection typically produces mild symptoms
81 that resolve rapidly. However, when infection occurs during pregnancy,
82 occasionally vertical transmission can lead to a spectrum of devastating
83 neurodevelopmental aberrations, collectively referred to as Congenital Zika
84 Syndrome (CZS) [16]. Conflicting data sets indicate that infants born to mothers
85 infected with ZIKV during pregnancy carry an up to 42% risk of developing overt
86 clinical or neuroimaging abnormalities [17-21].

87 ZIKV is closely related to 4 serotypes of DENV. They are a positive-sense
88 single stranded enveloped RNA virus. The genome encodes a polyprotein, which
89 is processed into three structural proteins (the capsid [C], premembrane [prM],
90 and the envelope [E] protein) and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A,

91 NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [22]. DENV and ZIKV share 55.1% to 56.3%
92 amino acid sequence identity [23].

93 Tonnerre and Colls performed a remarkably interesting longitudinal study with
94 samples from 10 non-pregnant women ZIKV-confirmed acute infection. For the
95 T cell response, the authors confirmed different virus-specific targets for CD4+
96 and CD8+ T cells [24] and, they found that previous DENV infections largely
97 affect the humoral response to ZIKV, with effects on the T-cell side limited to
98 increasing the frequency of ZIKV-specific CD8+ T cells in some patients [24, 25].

99 Although viral infections are common during pregnancy, transplacental
100 passage and fetal infection appear to be the exception rather than the rule. Viral
101 infections during pregnancy have been linked to adverse pregnancy outcomes
102 and birth defects in offspring; Unfortunately, there are limited therapeutic or
103 preventive tools to protect both mother and fetus during pandemics [26].

104 In the present study, we studied ZIKV memory T cell responses from a
105 cohort of mothers infected to the ZIKV during pregnancy in the 2016-2017 Zika
106 outbreak who gave birth infants affected by neurological complications or
107 asymptomatic ones. These donors with a history of ZIKV infection were evaluated
108 in 2018-2019, 2-3 years after ZIKV infection. This cohort provides a unique
109 opportunity to study ZIKV immunity in an infection occurred during pregnancy
110 and compare it with longitudinal follow up samples.

111

112 **Results**

113 **Donors with a History of ZIKV Infection and Detection of** 114 **ZIKV and DENV-specific IgG antibodies by commercial** 115 **ELISA**

116 ZIKV and DENV-specific immunoglobulin G (IgG) antibodies detection
117 were determined by the commercial capture enzyme-linked immunosorbent
118 assay (ELISA). From 21 mothers with a history of symptomatic ZIKV infection
119 tested, out of these 17 (81%) were positive for anti-ZIKV IgG detected while no
120 anti-ZIKV IgG could be detected in 4 (19%) of them. Fourteen(67%) were also
121 positive for anti-DENV IgG (anti-DENV IgG+/anti-ZIKV IgG+). We examined

122 the difference in antibodies detection among mother group. Similar data were
123 observed between mothers who had asymptomatic children and those had CZS
124 children, that is 83% and 78% had anti-ZIKV IgG detected and of these, 67% were
125 also detected anti-DENV IgG for both subgroups. Only 17% and 22% had no
126 detection for anti-ZIKV IgG, respectively.

127 Regarding the 18 children with a history of ZIKV intrauterine exposure to
128 ZIKV tested (two of them it was not possible to perform the dosage because the
129 sample volume was insufficient), only 12.5% had anti-ZIKV IgG and, in these
130 same individuals, anti-DENV IgG was also detected. Thus, unlike mothers, anti-
131 ZIKV IgG was not detectable in 87.5% of the children. The main difference
132 between the group of children is that 12.5% of asymptomatic children and 50% of
133 CZS children had anti-DENV IgG but not anti-ZIKV IgG. In addition, 75% of
134 asymptomatic children and 37.5% of CZS children had neither anti-DENV IgG
135 nor anti-ZIKV IgG.

136 The frequency of T cell subpopulations was assessed by flow cytometry
137 assay. Data on the percentage of CD4 and CD8 T cells and the ratio between the
138 two subpopulations showed no statistically significant difference between the two
139 donor cohorts ([Table 1](#)).

140

141 **Table 1: Characteristics of the recovered mothers infected to Zika virus**
 142 **during pregnancy and their intrauterine exposed children recruited from**
 143 **2018 to 2019.**

	Symptomatic Women RT-PCR ZIKV+ during pregnancy in 2016/2017		Children with intrauterine exposure to ZIKV in 2016/2017	
	clinical outcome of the child was asymptomatic	clinical outcome of the child was CZS	Asymptomatic	CZS
	n = 12	n =9	n =9	n =9
Age, years, median (range)^a	32.5 (21 – 41)	28 (21 – 42)	2.8 (2 – 3.4)	2.4 (1.4 – 2.7)
Illness time, years^a	3.2 (2 – 3.3)	3.3 (1.9 – 3.5)	3.2 (2 – 3.3)	3.1 (1.8 – 3.8)
Positivity of IgG, (%)				
anti-DENV IgG+/anti-ZIKV IgG-	0	11	12.5	50
anti-DENV IgG+/anti-ZIKV IgG+	67	67	12.5	12.5
anti-DENV IgG-/anti-ZIKV IgG+	17	11	0	0
anti-DENV IgG-/anti-ZIKV IgG-	17	11	75	37.5
Frequency of T cells, (%)^a				
CD4 T cells	66.8 (61 – 81.6)	71.3 (57.4 – 80.5)	67.4 (53.5 – 80.2)	70 (41.5 -80.3)
CD8 T cells	19.9 (5.5 – 31.1)	21.6 (13.9 – 24.3)	18.4 (14.2 – 35.5)	18.6 (7.4 – 35.1)
CD4/CD8 ratio	3.6 (2 – 12.7)	3.3 (2.4 – 5.8)	3.5 (1.5 - 5.4)	3.8 (1.3 – 10.4)

144 median (minimum – maximum)^a

145

146 **Effector / memory T cells profile based on CD127 expression**
 147 **and T-bet and GATA-3 transcription factors**

148 By using a combination of extracellular markers, including CD127 and T-
 149 bet and GATA-3 intracellular staining assays, we were able to successfully detect
 150 two distinct T cell populations, namely CD127^{low}, and CD127^{high} and also, Th/Tc
 151 polarization in mothers with a history of ZIKV infection and children with a

152 history of ZIKV intrauterine exposure to ZIKV used in this study (Fig 1A). We
153 observed a higher frequency CD127^{low}-expressing CD4 T cells compared to
154 CD127^{high}-expressing CD4 T cells in donor cohorts, and the differences were
155 statistically significant. Similar frequency of CD127^{low} and CD127^{high}-expressing
156 CD8 T cells was confirmed in both cohorts (Fig 1B).

157 It was of interest to determine the combined expression of T-bet or GATA-
158 3 and CD127 on CD4 and CD8 T cells as a convergence between Th1/Tc1 or
159 Th2/Tc2 commitment and effector/memory differentiation status. Based on our
160 data, we showed a larger frequency of circulating CD4⁺ CD127^{high} T-bet- GATA-
161 3⁺ T cells in mothers and children. Moreover, an increased frequency of CD8⁺
162 CD127^{low} T-bet⁺ GATA-3⁻ followed by far by CD8⁺ CD127^{high} T-bet- GATA-3⁺ T
163 cells in mothers. In children, CD8⁺ CD127^{low} T-bet⁺ GATA-3⁻ T cells and CD8⁺
164 CD127^{high} T-bet- GATA-3⁺ T cells subpopulations expanded in a very similar way
165 (Fig 1C-D). Thus, we report a naturally pre-marked polarization toward Th2 cells
166 expressing GATA-3 and CD127^{high} in mothers and children (Fig 1C), Tc1 cells
167 expressing T-bet and CD127^{low}, and Tc2 cells expressing GATA-3 and CD127^{high}
168 (Fig 1D) in the both donors. Of note, we investigated whether after stimulated for
169 20h with ZIKV peptides, PBMC would alter the expression of CD127, T-bet and
170 GATA-3 in T cell responses. For these purpose, we did not find a significant
171 change in any subpopulation, including in those subpopulations with increased
172 frequency CD4⁺ CD127^{high} T-bet- GATA-3⁺, CD8⁺ CD127^{low} T-bet⁺ GATA-3⁻
173 followed by CD8⁺ CD127^{high} T-bet- GATA-3⁺ T cells in mothers and children
174 donors.

175

176 **Detection of IFN γ -producing cells in response to ZIKV** 177 **peptides in women and mothers with a history of ZIKV** 178 **infection, but not in children with a history of intrauterine** 179 **exposure to ZIKV**

180 Next, we focused on analysis of virus specific T cell responses in donors
181 with a history of ZIKV infection. *Ex vivo* T cell responses to CD4 and CD8 ZIKV
182 megapools (CD4 and CD8 MP) employing the ELISPOT assay were measured to

183 quantify the number of antigen specific IFN- γ secreting cells. The general
184 characteristics of these donor's cohort are summarized in [Tables 1](#) and [2](#).

185 To ensure comparable quality of samples we first compared responses
186 induced by the positive control stimulus PHA. As expected, T cells from women
187 (from non-pregnant women infected with ZIKV, see [Fig 2](#)) and mothers (from
188 pregnant mothers infected with ZIKV, see [Fig 2](#)) with a history of ZIKV infection
189 responded to PHA with values above 250 SFC per 10^6 PBMC as well as the most
190 of children with a history of intrauterine exposure to ZIKV (from children born
191 to mothers infected with ZIKV during pregnancy, see [Fig 2](#)). One of the samples
192 collected from children responded to PHA with just over 70 SFC per 10^6 PBMC,
193 which resulted in 15 times greater stimulation with PHA compared to the
194 medium, so we decided to maintain this child from the analysis ([Fig 3A](#)).

195 In our ELISPOT assay, we were able to successfully detect that ZIKV-
196 specific T-cell responses utilizing the CD4 and CD8 MP, respectively. We detected
197 an IFN- γ response (131.9 [36.3 – 456.9] IFN- γ SFC/ 10^6) in 100% of samples for
198 CD4 and 80% (49.4 [6.3 – 145.8]) of samples for CD8 from women. In mothers,
199 (70.0 [18.3 – 140.8]) in 80% for CD4 and (65.0 [5.3 – 122.5]) for CD8 with 60%
200 of responders. These data demonstrated an appreciable reactivity both in terms
201 of increased frequency and magnitude of CD4 and CD8 responses, confirming a
202 high degree of T cell reactivity against ZIKV MPS. For children, no significant
203 level of magnitude of T cell responses was observed with ZIKV peptides (0.0 [0.0
204 – 8.0] for CD4 with none % of responders and 2.0 [0.0 – 10.0] for CD8 with 18%
205 of responders), with infrequent children responders for ex vivo ZIKV-specific T
206 cell responses ([Fig 3B](#)).

207 When we examined the difference in ZIKV-specific T cells response
208 between mothers, a fewer CD4 and CD8 responses to the ZIKV peptides were
209 noted in mothers who had CZS children (20.0 [10.0 – 96.5] for CD4 with 60% of
210 responders and 8.0 [0.0 – 71.0] for CD8 with 40% of responders) compared to
211 those who had asymptomatic children (90.0 [62.8 – 177.8] for CD4 with 100% of
212 responders and 112.5 [18.3 – 177.0] for CD8 with 80% of responders), but not
213 significantly different ([Fig 3C](#)). We also examined whether there is a difference in
214 ZIKV-specific T cells response between asymptomatic and CZS children and

215 observed a restricted T cell reactivity in the children with a history of intrauterine
216 exposure to ZIKV, independently of clinical status (Fig 3D).

217 These data could indicate that the most of children with a history of
218 intrauterine exposure to ZIKV might be associated with few or no significant
219 congenital infection by ZIKV. To address this issue, we measured antibodies IgG
220 anti-ZIKV in all children donor's cohort (Table 1). The results shown that IgG
221 anti-ZIKV were detected in 12.5% children and that, regardless, no significant T-
222 cell response was detected in children with a history of intrauterine exposure to
223 ZIKV. As demonstrated, we considered the possibility of the immunological
224 immaturity in young age, but we detected a prompt response to polyclonal
225 stimuli, indicating an immunocompetence of women, mothers, and children.

226 Finally, we ruled out that the few T-cell responses observed in children
227 might be due to a greater susceptibility of children's cells to death by performing
228 a live/dead staining after 20 h of culture. Only one child had < 50% live/dead
229 negative cells, the other donors had > 50% viability after stimulation with ZIKV
230 peptides. Thus, we will continue to investigate whether the T-cell response to
231 ZIKV peptides, especially in children with a history of intrauterine exposure to
232 ZIKV does not exist or is shorter.

233

234 **Higher CD4+ T cell degranulation ability compared to CD8+** 235 **T cell degranulation in donors with a history of ZIKV** 236 **infection**

237 Cytotoxic activity is one of the key components of the virus specific
238 protective immunity. Previous study showed a pre-dominantly cytotoxic
239 signature in ZIKV-specific CD8+ T cells from donors in the convalescent phase of
240 infection [25]. In this study, we measured the ability of ZIKV specific CD4 and
241 CD8 ZIKV to degranulate, i.e., that were CD107a positive (Fig 4A). The
242 proportion of CD107a+-expressing T cells to ZIKV peptides in women with a
243 history of ZIKV infection (from non-pregnant women infected with ZIKV, see Fig
244 2) (0.4 [0.2 – 3.2] for CD4 with 40% of responders and 0.1 [0.02 – 0.33] for CD8
245 with no responders) and mothers with a history of ZIKV infection (from pregnant
246 mothers infected with ZIKV, see Fig 2) (4.6 [2.2 – 8.8] for CD4 with 100% of

247 responders and 0.3 [0.1 – 0.4] for CD8 with only 13% of responders), showed
248 appreciable reactivity both in terms of increased frequency and magnitude of CD4
249 responses but a poor response on both parameters for CD8 responses. For
250 children with a history of intrauterine exposure to ZIKV (from children born to
251 mothers infected with ZIKV during pregnancy, see Fig 2), important level of
252 magnitude of T cell responses was observed after ZIKV peptides stimulation (3.8
253 [1.5 – 10.4] for CD4 with 89% of responders but 0.1 [0.1 – 0.5] for CD8 with no
254 responders) (Fig 4B). Thus, the analysis performed on CD4 T-cell responses
255 confirmed an important degranulation activity not significantly different after
256 ZIKV CD4 peptides between donors with a history of ZIKV infection, while a few
257 CD8 T-cell responses in all donors' groups after ZIKV CD8 peptides.

258 Further analysis revealed that degranulation activity of CD4 and CD8 T
259 cells against any of the ZIKV epitopes examined was not associated with mothers
260 who had asymptomatic children or not (Fig 4C), nor with protection from ZIKV
261 associated neurological impairment to the fetus (Fig 4D).

262 We compared the frequencies of ZIKV-specific CD107a-expressing CD4+
263 *versus* CD8+ T-cell “Responders” using a Fisher's exact test, and found
264 significant difference between the all donors ($p < 0.0001$), among the mother (p
265 < 0.0001) and among children ($p = 0.0004$), indicating that a higher degree of
266 CD4 T cell reactivity ZIKV responses compared to CD8 T cell reactivity ZIKV in
267 donors with a history of ZIKV infection even 2–3 years ago (Fig 4E).

268 Results of CD107a-expressing CD4+ T-cell for ZIKV peptides were not
269 concordant in mother-child pairs (tested pairs $n = 6$): overall, concordant results
270 were obtained for 4/6 (66.7%) tested pairs, in which responsive mothers had
271 responsive children to the ZIKV CD4 peptides. Two cases the mother showed a
272 positive CD4 response for ZIKV, while their children were not. For CD8 response
273 to the ZIKV CD8 peptides, concordant results were obtained for 5/6 (83.3%)
274 tested pairs, in which non-responsive mothers had non-responsive children. One
275 case the mother showed a positive CD8 response for ZIKV, while their children
276 were not (Fig 4F).

277

278 **Higher IFN- γ producing ZIKV CD4+ T cell responses persist**
279 **in donors with a history of ZIKV infection by ICS assay**

280 By using a ZIKV megapools stimulation and intracellular cytokine staining
281 (ICS) assays (Fig 5A), we were able to determine the responding T cell subsets
282 (CD4 and CD8) as well as the memory subset. Donors cells with a history of ZIKV
283 infection were stimulated with polyclonal PMA + ionomycin, confirming the
284 viability of all samples (Fig 5B). In a further series of experiments, CD4 T cells
285 from all donors responded to the ZIKV CD4 peptides in terms of increased
286 frequency and magnitude of responses (Fig 5C). The proportion of IFN γ +
287 expressing T cells to ZIKV peptides in women with a history of ZIKV infection
288 (from non-pregnant women infected with ZIKV, see Fig 2) was 0.13 [0.07 – 0.8]
289 for CD4 and 0.09 [0.0 – 0.3] for CD8. For mothers, it was detected 0.2 [0.04 –
290 0.4] for CD4 and 0.04 [0.0 – 0.1] for CD8. Finally, children showed 0.14 [0.01 –
291 0.3] for CD4 and 0.0 [0.0 – 0.04] for CD8. Thus, all donors showed appreciable
292 reactivity both in terms of increased frequency and magnitude of IFN γ -producing
293 CD4 responses but a lower response for CD8 responses. The degree of CD4 T cell
294 reactivity was seen in 50% of women, 77% of mothers and in 62% of children.
295 However, fewer CD8 T cells from women, mothers and children donors
296 recognized the ZIKV CD8 megapool in terms of frequency and magnitude of
297 responses. Indeed, it was seen 17%, 39% and 8% of women, mothers and children
298 were responders to CD8 ZIKV epitopes, respectively (Fig 5C).

299 Again, we examined the difference in ZIKV-specific T cells response among
300 mothers' group. CD4 responses to ZIKV peptides were higher magnitude in
301 mothers whose had asymptomatic children than those had children with CZS but
302 were not significantly different. The frequency of *ex vivo* responses in ZIKV in
303 mothers was 100% and 57% for CD4 responses in mother whose had
304 asymptomatic children and those had children with CZS respectively (Fig 5D).
305 CD8 responses in mothers were detected in approximately 50% and 29% of the
306 cases of mothers whose had asymptomatic children and those had children with
307 CZS respectively (Fig 5D).

308 When we examined the difference in ZIKV-specific T cells response among
309 children, CD4 responses to ZIKV peptides were higher magnitude in CZS children
310 than in asymptomatic children but were not significantly different, with similar

311 frequency of *ex vivo* CD4 responses in ZIKV with 50% asymptomatic children and
312 71% CZS children. Marginal CD8 responses to the ZIKV peptides were noted in
313 children in which 17% asymptomatic children and none CZS children responded
314 for ZIKV peptides (Fig 5E).

315 We compared the frequencies of ZIKV-specific IFN- γ -producing CD4+
316 *versus* CD8+ T-cell “Responders” using a Fisher's exact test, and found
317 significant difference between the all ZIKV-donors ($p = 0.0006$), among the
318 mother's donors ($p = 0.0169$) and among children's donors ($p = 0.0302$),
319 indicating that a higher degree of CD4 T cell reactivity ZIKV responses compared
320 to CD8 T cell reactivity ZIKV responses in donors with a history of ZIKV infection
321 even 2–3 years ago (Fig 5F).

322 Results of IFN- γ -producing CD4+ T-cell for ZIKV peptides were not
323 concordant in mother-child pairs (tested pairs $n = 7$): overall, concordant results
324 were obtained for 2/7 (28.6%) tested pairs, in which responsive mothers had
325 responsive children to the ZIKV CD4 peptides. Three cases the mother showed a
326 positive CD4 response for ZIKV, while their children were not. The reverse was
327 seen in the other two cases. For CD8 response to the ZIKV CD8 peptides,
328 concordant results were obtained for 4/7 (57.1%) tested pairs, in which non-
329 responsive mothers had non-responsive children. Three cases the mother showed
330 a positive CD8 response for ZIKV, while their children were not (Fig 5G).

331 Finally, we compared the ZIKV-specific IFN- γ -producing CD4+ and CD8+
332 T-cell responses as measured by ICS *versus* ELISPOT assays. We used a Fisher's
333 exact test to compare the frequencies of “Responders” by ICS and ELISPOT
334 assays, and found no significant difference between the results of the two
335 methods, except for when we examined ZIKV-specific CD4+ T cells response
336 among children group ($p = 0.0294$).

337

338 **Predominant response of memory CD4T cells re-expressing** 339 **CD45RA (Temra) in donors with a history of ZIKV infection**

340 To further determine the memory subset of virus specific T-cell responses
341 to ZIKV megapool, we analyzed the expression of CD45RA and CCR7 on the
342 responding T cells and compared it to the total CD4 and CD8 population. In

343 women with a history of ZIKV infection (from non-pregnant women infected with
344 ZIKV, see Fig 2), the majority of the unspecific CD4 T cells displayed a frequency
345 of naïve (Tn, CD45RA+CCR7+; 50%) followed by the central memory phenotype
346 (Tcm, CD45RA-CCR7+; 37%), an effector memory phenotype (Tem,
347 CD45RA-CCR7-; 15%) and finally by an effector memory re-expressing CD45RA
348 (Temra, CD45RA+CCR7-; 0.9%). In mothers with a history of ZIKV infection
349 (from pregnant mothers infected with ZIKV, see Fig 2) was observed a similar
350 frequency of the unspecific CD4 T cells displayed a central memory phenotype
351 (Tcm; 47%) and a naïve (Tn; 41%), then, an effector memory phenotype (Tem;
352 11%) followed by an effector memory re-expressing CD45RA (Temra; 0.5%). As
353 expected, in children with a history of intrauterine exposure to ZIKV (from
354 children born to mothers infected with ZIKV during pregnancy, see Fig 2), the
355 most CD4 T cells exhibited a naïve (Tn; 72%) phenotype, followed by a central
356 memory cells (Tcm; 23%), an effector memory phenotype (Tem; 4%) and an
357 effector memory re-expressing CD45RA (Temra; 0.4%) (Fig 6A).

358 For the unspecific CD8 T cells, women, mothers and children had
359 comparable frequency of all subsets of T cells, exhibiting predominantly a naïve
360 cells (Tn, CD45RA+CCR7+; 64% in women, 58% in mothers and 63% in
361 children), followed an effector memory phenotype (Tem, CD45RA-CCR7-; 23%
362 in women and 16% in both mothers and children donors), an effector memory re-
363 expressing CD45RA (Temra, CD45RA+CCR7-; 9%, 15% and 11%, respectively),
364 and lastly a central memory cells (Tcm, CD45RA-CCR7+; 6%, 10% and 7%,
365 respectively) (Fig 6A).

366 Further analysis demonstrated that, phenotypic analysis of the responding
367 CD4 T cells for ZIKV epitopes revealed that the IFN- γ + cells were mostly
368 contained in the Temra (CD45RA+CCR7-) memory T cell subsets in women,
369 mothers and children (Fig 6B). In terms of the IFN- γ -responding CD8 T cells
370 for ZIKV epitopes, no difference was seen in the frequency of naïve or memory
371 phenotype in donors with a history with ZIKV infection (Fig 6B).

372

373 **Discussion**

374 In the present we aimed to evaluate the ZIKV specific T cell response in
375 donors with a history of ZIKV infection during pregnancy. Regarding the few
376 current studies that raise the same questions, our group has advanced when
377 compared non-pregnant women, pregnant mothers and, also asymptomatic and
378 CZS children born to mothers infected with ZIKV during pregnancy.

379 It is essential to understand the repertoires of the ZIKV effector T cell
380 response to the point of extrapolating if the development of a non-protective
381 immunity in mothers is related to the affected children. In addition, in pregnancy
382 and congenital infection scenarios, it is not known if there is a development of
383 long-lasting T cell immunity to ZIKV. To address these issues, the ZIKV T-cell
384 immunity in a cohort of mothers infected with ZIKV during pregnancy and
385 children affected (or not) by neurological complications was assessed 2-3 years
386 after the initial infection.

387 If previous DENV cross-reactive immunity contributes to protection
388 against or pathogenesis of ZIKV infection during pregnancy is still unclear and
389 understanding the role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the context
390 of pregnancy is critical. During the Brazilian ZIKV epidemic 2016–2017, 94
391 pregnant women who gave birth to infants with or without microcephaly were
392 evaluated. Based on previous studies, DENV immunity is not a prerequisite for
393 ZIKV entry into the fetal compartment [27]. Halai and colleagues supported
394 Araújo's findings [28]. In contrast, ZIKV-infected human placental tissues
395 showed increased replication in the presence of DENV antibodies, dependent on
396 FcγR engagement [29]. A remarkably interesting study using mouse model
397 showed that the presence of DENV-specific antibodies in ZIKV-infected pregnant
398 mice significantly increased placental damage and frequency of infected
399 trophoblasts, restriction of fetal growth, and fetal resorption [29]. Thus,
400 conflicting data sets regarding the impact of ADE on congenital malformations in
401 babies have emerged from different studies, including mouse and non-human
402 primates' models and human donors. Based on Zimmerman's review additional
403 prospective epidemiologic studies, *ex vivo* studies, and animal model
404 experimentation are needed to fully dissect the complex risk factors and pathways
405 through which ZIKV can seed and infect the fetal compartment [30].

406 Even so, this can be framed if the mothers' ZIKV T-cell effector immune
407 response repertoires are “weak”, to the point of not giving protective immunity to
408 the affected children. So far data addressing this issue is only available in murine
409 model [31]. The authors evaluated adapted mouse models established for ZIKV
410 infection during pregnancy. Interestingly, they observed a reduction in a load of
411 ZIKV in maternal and fetal tissues and an increase in fetal viability and growth in
412 mice immune to DENV compared to non-immune mice. The depletion or genetic
413 deficiency of CD8+ T cells nullified this effect, even under ADE conditions [31].
414 A single study on pregnancy and immunity to ZIKV in human patients was
415 recently developed by Reynolds and colleagues. The authors showed that almost
416 all mothers with a history of ZIKV infection have serological evidence of
417 immunity to dengue, suggesting that their children who had microcephaly were
418 born to mothers' immune to DENV. In addition, they showed that different viral
419 products can induce a multifunctional response to E and NS1 antigens and, also
420 immunoregulatory responses to NS5 and C ZIKV proteins, which could impact
421 immunopathogenesis [32]. From our data set, it is not yet clear if children who
422 had microcephaly were born to mothers with “an altered, weak or different”
423 response to T cells from mothers who had asymptomatic children. Our hypothesis
424 is that it would be necessary to have acute samples of pregnant mothers in order
425 to answer this question with greater propriety.

426 On the other hand, in the scenarios of pregnancy and congenital infection,
427 little is known whether mothers and babies with a history of ZIKV infection were
428 able to develop lasting T-cell immunity to the Zika virus. We carried out an initial
429 approach to answer this question, for this we evaluated the expression of the
430 effector cell/memory marker CD127 and the Th1/Th2 or Tc1/Tc2 profile in
431 mothers and children with a history of ZIKV infection. It is extensively accepted
432 that IL-7 is the main cytokine regulating naïve and memory CD4+ and CD8+ T
433 cell homeostasis and the expression level of the α chain of the IL-7 receptor (IL-
434 7R α , also called CD127) determines the sensitivity of T cells to IL-7 [33]. In
435 Celleraï's study, they have shown that CD127 is associated with the presence of
436 virus specific CD8 T cells endowed with higher proliferation capacity but, a lack
437 of cytotoxic activity, as an important in protective antiviral immunity [34].
438 Corroborating Celleraï's data, it was shown in mice [35] and humans [36-38] that
439 the CD127^{high} expression has been shown to correlate with antigen-specific or

440 polyclonal stimulation proliferation of the memory-precursor IL-2-producing
441 CD8⁺ T cells. Alternatively, CD127 is also used as a marker that distinguishes
442 effector/memory from T regulatory cells when combined with CD25. Thus, unlike
443 most activated T cells, which rapidly reexpress CD127 and memory T cells that
444 express high levels of CD127, the T regulatory cell population remains
445 CD127^{low/negative} characterized by a highly suppressive in functional suppressor
446 assays [39]. Here, we demonstrated a larger frequency of circulating CD8⁺
447 CD127^{low} T-bet⁺ GATA-3⁻ T cells followed by far by CD8⁺ CD127^{high} T-bet⁻ GATA-
448 3⁺ T cells in mothers and children with a history with ZIKV infection. Our data
449 did not indicate that CD127 is a relevant marker of T cells endowed with
450 proliferation capacity after *in vitro* ZIKV peptides stimulation, once we did not
451 detect any change in the frequency of the CD127 subsets after 20h of stimulation
452 with ZIKV peptides. The likely scenario suggested by these data is that CD127^{high}
453 T-bet⁻ GATA-3⁺ T cells population expand through the upregulate CD127 and
454 acquire humoral activity with antibody production in individuals exposed to
455 ZIKV. The production of neutralizing antibodies has been reported to be
456 associated with controlling viral replication and protection against secondary
457 ZIKV infection in two independent cohorts of patients in Brazil and Mexico [40],
458 human [41-45], rhesus macaques [46] and mouse models [43, 47-49]. However,
459 evidence from seroprevalence studies in French Polynesia and Fiji found that
460 levels of ZIKV neutralizing antibodies decrease with time [50]. If the fall in
461 antibody levels means that people become susceptible to infection again,
462 population level ZIKV immunity might be declining already. We do not know the
463 immunological or clinical significance of the frequency of CD127^{high} T-bet⁻ GATA-
464 3⁺ cells in humoral and cellular immunity to ZIKV. It is possible that a
465 significantly higher relative frequency of pre-committed Th2 and Tc2 cells would
466 be able to secrete higher levels of humoral cytokines. In addition, CD127^{high} cells
467 could constitute a highly active subset of memory T cells that can play a role in
468 controlling inflammation and maintaining a humoral response in individuals
469 exposed to ZIKV.

470 Outside the context of donors infected during pregnancy or by congenital
471 infection, several studies have been evaluating of the T cell responses to ZIKV
472 proteins in human donors immune or not to DENV. It is known that ZIKV-
473 reactive T cells in the acute phase of infection are detected earlier and in greater

474 magnitude in DENV-immune patients. Conversely, the pattern of CD4 responses
475 to ZIKV-restricted class II peptides was remarkably similar in acute and
476 convalescence phases, while a lower frequency and magnitude of responses were
477 observed with the CD8 counterpart [51]. In another study, Grifoni's data
478 indicated an immunological signature for CD8+ T cell responses reproducible
479 and temporally stable after Ag-specific stimulation even 1–2 years after ZIKV
480 infection [25]. Moreover, circulating tetramer-positive ZIKV-specific CD8+ T-
481 cells peaked at early convalescence day post-infection with elevated levels
482 persisting for months from a volunteer woman [52]. On the other hand, whereas
483 C-, prM-, E-, and NS5-specific cytokine-expressing CD4+ T cells were readily
484 detected in all patients tested, absent or low detection of functional CD8+ effector
485 T cells against peptides spanning ZIKV C, prM, E, and NS5 were identified [53].
486 We agree with Lai's study using peptides that span all 10 ZIKV proteins. Our data
487 indicate that after *in vitro* stimulation with the ZIKV megapool, CD4+ T cells
488 maintain their degranulation and IFN γ production capacity, which was not
489 observed by CD8+ T cells. One possibility is that the cytotoxic and pro-
490 inflammatory activities of CD8+ T cells are high at an early stage of ZIKV
491 infection, but do not persist in the disease resolution phase when the virus has
492 apparently been eliminated.

493 The protective role of CD8+ T cells has been demonstrated in several
494 studies using mouse models. Huang's study demonstrated that an adoptive
495 transfer of ZIKV-immune CD8+ T cells can protect against ZIKV infection [54].
496 Indeed, polyfunctional, cytotoxic CD8+ T cells are activated [55], reducing ZIKV
497 burden and, in the same sense, CD8 depletion or genetic absence resulted in
498 greater ZIKV infection and mortality in mice [56]. Moreover, ZIKV-specific and
499 ZIKV/DENV cross-reactive CD8+ T cells in DENV-immune mice expanded post
500 ZIKV challenge and reduced infectious ZIKV levels, and CD8+ T cell depletion
501 confirmed this protection [57]. Nevertheless, within a susceptible mouse model,
502 CD8+ T cells appear as an important mediator of ZIKV neuropathogenesis [58-
503 59]. It is currently impossible to determine what the impact of the short duration
504 of ZIKV-specific CD8 + T cells will be for donors with a history of ZIKV infection.
505 Unfortunately, only with the emergence of new ZIKV epidemics, this issue can be
506 assessed.

507 In relation to ZIKV-specific CD4⁺ T cell responses in Zika patients,
508 Koblischke and colls. showed a strong impact of Structural ZIKV protein on
509 immunodominant CD4 T cell responses [60]. Interestingly, that most of CD4-
510 Temra are DENV-specific in donors with previous DENV infection [61]. Patil and
511 colls. revealed in dengue patients that these CD4⁺ T cells in the Temra subsets
512 are highly enriched for CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes expressing several genes
513 linked to cytotoxic and costimulatory function, compared with CD4⁺ T cells in
514 the central memory (Tcm) and effector memory (Tem) subsets [62]. Tian and
515 colls. revealed that the CD4 Temra cells can be subdivided into two major subsets
516 between DENV-immune individuals based on the expression of the adhesion G
517 protein-coupled receptor GPR56. While GPR56⁺ Temra cells display a
518 transcriptional and proteomic program with cytotoxic features, GPR56⁺ Temra
519 cells have higher levels of clonal expansion and contain the majority of virus
520 specific Temra cells [63]. Overall, like DENV infection, our data indicate that
521 most of IFN- γ producing CD4 T cells are effector memory re-expressing CD45RA
522 (Temra) are ZIKV-specific in donors with a history of ZIKV infection. Future
523 efforts will be underway in our laboratory to assess whether the heterogeneity of
524 CD4 Temra T cells could provide insights to differentiate the outcome of the
525 child's congenital infection in T cell responses against ZIKV.

526 However, some points limit and, therefore, should be considered when
527 interpreting our findings. First, to understand the evolution of the acquired ZIKV
528 immunity, the best would be a “longitudinal study” in which donors were
529 monitored in the acute and convalescent phases and after completely recovered
530 from the disease. Second, the diagnosis of ZIKV by RT-PCR was not performed
531 in newborns, so we cannot affirm whether they were vertically infected, especially
532 in asymptomatic ones. Third, it was not possible to carry out many analyzes of
533 paired mothers and children, mainly due to the clinical complications of the
534 children during the study, which made it difficult to define a close association
535 between the immunity of mothers and the clinical outcome of their children.
536 Fourth, there are still concerns about the risks of serological cross-reactivity as a
537 confounding factor in commercial ELISA screening, so additional serological
538 tests should be realized to determine if anti-ZIKV and anti-DENV antibodies
539 detected in our donors were associated with neutralizing activity and the
540 specificity of these antibodies. Fifth, we cannot formally exclude the possibility

541 that DENV or chikungunya virus exposure and yellow fever vaccination have
542 distorted or altered the responses of T cells to ZIKV peptides in some way.

543 In summary, we studied donors with a history of ZIKV infection during the
544 2016-2017 outbreak in Brazil, including non-pregnant women and pregnant
545 mothers infected with ZIKV and children with a history of intrauterine exposure.
546 We show evidence that the responses of ZIKV-specific T cells in mothers appear
547 to be unrelated to their children's clinical outcomes. Regardless, if ZIKV infection
548 occurred during pregnancy or congenitally, all donors with a history of ZIKV
549 infection demonstrated lasting immunity to ZIKV-specific CD4 T cells after 2-3
550 years ago of the ZIKV infection, but not CD8 T cells. Future outbreaks of ZIKV
551 may clarify the consequence of short-lived immunity from CD8 T cells.

552

553 **Materials and Methods**

554 **Study design, volunteers, and samples**

555 A cross-sectional study was carried out in the pregnant mothers infected
556 with ZIKV and children born to mothers whose reported rash during pregnancy
557 overlapping with the ZIKV Public Health Emergency of National Concern in
558 Brazil period (November 2015 and May 2017). These donors' cohort was referred
559 from Exanthematic Diseases Unit at the Hospital Universitário Antonio Pedro of
560 the Universidade Federal Fluminense (HUAP/UFF) located in Niteroi, Rio de
561 Janeiro (Brazil). Laboratory evidence for ZIKV infection during pregnancy was
562 based on mother's positive RT-qPCR test results on serum and/or urine samples,
563 done at the flavivirus reference laboratory of Rio de Janeiro State (LACEN, RJ,
564 Brazil) and confirmed by Multiuser Laboratory for Research Support in
565 Nephrology and Medical Science (LAMAP, UFF, Brazil) [64]. A RT-qPCR positive
566 test result at any point after maternal rash onset confirmed ZIKV infection within
567 the first five days of rash and/or the urine sample was tested by the 14th day. So,
568 we included 21 pregnant mothers who presented rash, with or without other
569 clinical symptoms suggestive of arboviruses infections, such as arthralgia,
570 myalgia, fever, headache, and conjunctival hyperemia (Table 2). Exclusion criteria
571 was mothers who were positive with a qRT-PCR for other arboviruses as
572 Chikungunya and Dengue. Moreover, mothers presented positive test to syphilis,

573 toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, and HIV infection were excluded. All
574 serology tests were performed by the Service of Clinical Pathology (HUAP, UFF
575 Brazil) ([Fig 2](#)).

576

577 **Table 2: Cohort of mothers infected to Zika virus during pregnancy**
 578 **and their intrauterine exposed children in the 2016–2017 Zika**
 579 **outbreak.**

	Symptomatic Women RT-PCR ZIKV+ during pregnancy in 2016/2017 ⁿ⁼²¹	Children with intrauterine exposure to ZIKV in 2016/2017 ^{n= 18}
	clinical outcome of the child was asymptomatic	clinical outcome of the child was Asymptomatic CZS
n patients	n= 12	n= 9
Gestational trimester at onset rash, n (%)		
1°	0	3 (33)
2°	10 (83)	4 (44)
3°	2 (17)	1 (11)
Before pregnancy	0	1 (11)
Presence of symptoms, n (%)		
Fever	5 (42)	2 (22)
Headache	2 (17)	3 (33)
Myalgia	4 (33)	3 (33)
Arthralgia	7 (58)	2 (22)
Conjunctival hyperemia	2 (17)	3 (33)
Infant outcome at birth, n (%)		
Asymptomatic	12 (100)	0 (0)
Microcephaly	0 (0)	4 (44)
Congenital Zika Syndrome (CZS)	0 (0)	7 (78)

580

581 Eighteen children with a history of intrauterine exposure to ZIKV were
582 classified to asymptomatic or with CZS if they tested negative for other congenital
583 infections. Infants with microcephaly were evaluated according to Brazil's
584 Ministry of Health protocol [65]. Clinical and laboratorial examination was
585 performed by a multidisciplinary team coordinated by Dr. Claudete Araújo
586 Cardoso in all newborns. Neuroimaging, such as cranial ultrasound, computed
587 tomography or magnetic resonance was performed to investigate radiologic
588 aspects compatible with congenital infectious diseases (Table 2 and Fig 2).

589 From 2018 to 2019, blood donations from these donors with a history of
590 ZIKV infection were collected at HUAP/UFF for use in our study. Previous
591 exposure to DENV or ZIKV were determined by the presence of detectable DENV-
592 specific IgG titers [66] or ZIKV-specific IgG titers [67] (Fig 2).

593 As a control group, we had 5 non-pregnant women infected with ZIKV in
594 the same time frame (2015-2017). These controls were invited to participate in
595 this study because they had confirmed the diagnosis of ZIKV by qRT-PCR and
596 have positive anti-ZIKV IgG serology. All were similar in age compared to the
597 group of mothers (Fig 2).

598 DENV and chikungunya RNA were not detected in all patients tested,
599 excluding coinfections.

600

601 **Detection of Dengue IgG and Zika antibodies with an in-** 602 **house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

603 Serum samples were tested using ELISA IgG specific for ZIKV and DENV.
604 Detection of dengue specific IgG antibodies (Panbio, Australian) and zika specific
605 IgG antibodies (Euroimmun, Germany) were performed according to the
606 manufacturer's protocol. These ELISA were standardized for use as
607 recommended after studies by the Ministry of Health in Brazil. However, there
608 are concerns about the genuine potential for serological cross-reactivity as a
609 confounding factor in ELISA screening.

610

611 **PBMC isolation**

612 Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma were
613 isolated by Ficoll-Paque™ PLUS density gradient centrifugation (GE Healthcare)
614 and frozen in fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen Co) containing 10%
615 (vol/vol) Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich). Cells were thawed on the day of the
616 experiment and were used directly for *in vitro* assay.

617

618 **ZIKV CD4 and CD8 MegaPools (MPs) description**

619 ZIKV CD4 and CD8 pool of peptides (MegaPool, MP) have been designed
620 and validated, as previously reported [68-69]. Briefly, a consensus sequence was
621 generated by MAFFT alignment after querying NCBI polyprotein ZIKV sequences
622 available and BLAST to a corresponding ZIKV isolate able to represent most of
623 the viral sequence analyzed (ID: 64320) [70]. Two different strategies have been
624 then applied based on the ZIKV polyprotein sequence to predict CD4 and CD8
625 epitopes using TepiTool [71] available in IEDB analysis resource (IEDB-AR) [72].
626 Specifically, to design the ZIKV CD4 MP, the “7-allele-method” [73] was applied
627 with a cutoff of ≤ 20 , while for the ZIKV CD8 MP the epitopes were predicted
628 using the panel of 27 most frequent A & B alleles with custom selection to consider
629 both 9-mers and 10-mers for the prediction [74] and consensus percentile rank
630 cutoff ≤ 1.5 . The resulting predicted epitopes have been separately clustered for
631 CD4 and CD8 using IEDB cluster 2.0 tool applying the cluster-break method with
632 70% cut off for sequence identity [75]. The corresponding peptides derived by the
633 bioinformatics analyses were synthesized as crude material (A&A, San Diego,
634 CA), resuspended in DMSO, and pooled according to CD4 or CD8 MP
635 composition followed by sequential lyophilization [70].

636

637 **IFN- γ ELISpot assay**

638 Frozen collected PBMCs were assayed for IFN- γ cell responses, as
639 previously described [51]. Briefly, multiscreen 96-well plates (Multiscreen HTS;
640 Millipore) were capture mouse anti-human IFN- γ antibody (clone 1-DK1;
641 Mabtech) coated at 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluted in Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.2-
642 7.4 (Sigma-Aldrich). PBMCs were then added in triplicate to wells (2×10^5

643 cells/well) in the presence or not of ZIKV megapools at 1 µg/mL, followed
644 incubation at 37°C, 5% CO₂ for 18 to 20 hours. After washing with PBS–Tween
645 20, 1 µg/mL of IgG biotinylated anti-human IFN-γ (clone 7-B6-1; Mabtech) was
646 added and incubated for 2 hours at room temperature. After washing,
647 streptavidin-alkaline phosphatase substrate (Mabtech) was prepared and added
648 to the plate, for 1h at room temperature. Plates were washed, and alkaline-
649 phosphatase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue
650 tetrazolium chloride (BCIP-NBT); KPL (Gaithersburg) was added allowing spots
651 to develop. The reaction was stopped by washing with tap water. Spots were
652 counted using an automated ELISPOT reader (ImmunoSpot1S6UV Ultra,
653 Cleveland). The number of IFN-γ-producing cells was expressed as spot-forming
654 cells (SFC) relative to 10⁶ PBMCs. Values were calculated by subtracting the
655 number of spots detected in unstimulated control wells. Values were considered
656 positive if they were equal or greater than 20 spots and at least two times above
657 the mean of unstimulated control wells. The stimulation with
658 phytohemagglutinin (PHA 5 µg/mL) will be done for all individuals analyzed as a
659 positive control of in vitro stimulation.

660 We have previously established an approach in which, prior to initiating
661 the ELISpot assay, we recovered stimulated PBMCs for 20-h and stained with Abs
662 listed in [Supplementary Table S1](#) for extracellular staining used for flow
663 cytometry experiments.

664

665 **Intracellular cytokine staining**

666 PBMCs (2 × 10⁵ cells/well) were cultured 6 h with 1 µg/ml ZIKV megapools
667 and brefeldin A [51]. Subsequently, the stimulated PBMC were stained with the
668 Abs used for flow cytometry experiments listed in [Supplementary Table S1](#). The
669 intracellular cytokine staining was performed then permeabilized with saponin
670 (0.05%), stained with anti-IFN_γ antibody. The stimulation with phorbol and
671 ionomycin myristate acetate (PMA/Ionomycin) was performed for all individuals
672 analyzed as a positive control of in vitro stimulation. The data were collected
673 using BD FACS ARIA IIu flow cytometer and analyzed using FlowJo 10.5.2
674 software (Tree Star¹, USA).

675 **Statistics analysis**

676 Comparisons between different groups were performed using either
677 nonparametric Mann-Whitney rank sum test or parametric unpaired t-test (two
678 tail analyses), when data follow a normal distribution or paired Wilcoxon's test.
679 Outcome variables was compared among the groups of study using Kruskal
680 Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. Multiple comparison
681 tests were used to compute post-hoc comparisons for all pairs of groups.
682 Statistical significance for differences in frequency of "Responders" was
683 performed using a Fisher's exact test. The statistical comparisons planned rely on
684 accurate classification of outcome and detection of arbovirus infections and CZS
685 in infants. Data in all figure parts in which error bars are shown are presented as
686 median with interquartile range [25 to 75%]. Analyzes was performed with
687 GraphPad PRISM (version 5) (GraphPad Software). $p < 0.05$ was considered
688 statistically significant.

689

690 **Study approval**

691 These patients were recruited from the Exanthematic Diseases Unit at the
692 HUAP/UFF, Niteroi city, RJ, Brazil. All activities were performed after obtaining
693 the informed consent of mothers and parents of children. This approved study is
694 titled "Clinical follow-up of pregnant women with rash and their children:
695 prospective study cohort" with approval number 56913416.9.0000.5243.

696

697 **Acknowledgments**

698 The authors thank children and their families that participated in the
699 study, Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências
700 Médicas/LAMAP, Unidade de Pesquisa Clínica/UPC, and Zika Collaborative
701 Group and, Dr. Remberto Mauricio de la Cruz Vargas Vilte for his valuable and
702 stimulating scientific discussions.

703

704 **Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in
705 the absence of any commercial or financial relationships that could be construed
706 as a potential conflict of interest.

707

708 **References**

- 709 1- Perkins TA, Siraj AS, Ruktanonchai CW, Kraemer MU, Tatem AJ. Model-
710 based projections of Zika virus infections in childbearing women in the
711 Americas. *Nat Microbiol.* 2016;1(9):16126.
- 712 2- Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus
713 Threat. *N Engl J Med.* 2016;374(7):601-4.
- 714 3- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al.
715 Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-
716 based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 6:e1760.
- 717 4- Brady OJ, Hay SI. The first local cases of Zika virus in Europe. *Lancet.* 2019
718 394:1991–2.
- 719 5- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The
720 global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-7.
- 721 6- Messina JP, Kraemer MU, Brady OJ, Pigott DM, Shearer FM, Weiss DJ, et al.,
722 Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife.* 2016
723 19:e15272.
- 724 7- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B,
725 Piorkowski G, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J*
726 *Med.* 2016; 374:2195-8.
- 727 8- Fréour T, Mirallié S, Hubert B, Splingart C, Barrière P, Maquart M, et al.
728 Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple
729 returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Euro Surveill* 2016;
730 21.
- 731 9- Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, Fernandez E, Drury A, Platt DJ, et al. Zika
732 virus infection damages the testes in mice. *Nature* 2016; 540:438-42.
- 733 10- Ma W, Li S, Ma S, Jia L, Zhang F, Zhang Y, et al. Zika Virus Causes Testis
734 Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell* 2017; 168:542.

- 735 11- Tang WW, Young MP, Mamidi A, Regla-Nava JA, Kim K, Shrestha S. A Mouse
736 Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell*
737 *Rep* 2016; 17:3091-8.
- 738 12- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, et al.
739 The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models.
740 *Nature* 2016; 534:267-71.
- 741 13- Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika
742 Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal
743 Demise. *Cell* 2016; 165:1081-91.
- 744 14- Venturi G, Zammarchi L, Fortuna C, Remoli ME, Benedetti E, Fiorentini C, et
745 al. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission,
746 Florence, Italy, 2014. *Euro Surveill* 2016; 21:30148.
- 747 15- Yockey LJ, Varela L, Rakib T, Khoury-Hanold W, Fink SL, et al. Vaginal
748 Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. *Cell*
749 2016; 166:1247-56.
- 750 16- Lima GP, Rozenbaum D, Pimentel C, Frota ACC, Vivacqua D, Machado ES, et
751 al. Factors associated with the development of Congenital Zika Syndrome: a
752 case-control study. *BMC Infect Dis.* 2019 19:277.
- 753 17- Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, et
754 al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*
755 2016; 375:2321-34.
- 756 18- Costa F, Sarno M, Khouri R, de Paula Freitas B, Siqueira I, Ribeiro GS, et al.
757 Emergence of Congenital Zika Syndrome: Viewpoint From the Front Lines.
758 *Ann Intern Med* 2016; 164:689-91.
- 759 19- França GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi
760 VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first
761 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 2016; 388:891-7.
- 762 20- Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WT, do Carmo GM,
763 Henriques CM, Coelho GE, Araújo de França GV. Increase in Reported
764 Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with
765 Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy
766 - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65:242-7.
- 767 21- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika
768 Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 374:951-8.

- 769 22-Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al.
770 Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*.
771 2015;89(17):8880-96.
- 772 23-Ngono AE, Shrestha S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev*
773 *Immunol*. 2018;36:279-308.
- 774 24-Tonnerre P, Melgaço JG, Torres-Cornejo A, Pinto MA, Yue C, Blümel J, et al.
775 Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute
776 Zika virus infection. *Nat Microbiol*. 2020;5(1):76-83.
- 777 25-Grifoni A, Costa-Ramos P, Pham J, Tian Y, Rosales SL, Seumois G, et al.
778 Cutting Edge: Transcriptional Profiling Reveals Multifunctional and
779 Cytotoxic Antiviral Responses of Zika Virus-Specific CD8+ T Cells. *J Immunol*
780 2018; 201:3487-91.
- 781 26-Racicot K, Mor G. Risks associated with viral infections during pregnancy. *J*
782 *Clin Invest* 2017;127:1591-9.
- 783 27-de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-
784 Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, et al; investigators from the
785 Microcephaly Epidemic Research Group; Brazilian Ministry of Health; Pan
786 American Health Organization; Instituto de Medicina Integral Professor
787 Fernando Figueira; State Health Department of Pernambuco. Association
788 between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May,
789 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* 2016;
790 16:1356-3.
- 791 28- Halai UA, Nielsen-Saines K, Moreira ML, de Sequeira PC, Junior JPP, de
792 Araujo Zin A, et al. Maternal Zika Virus Disease Severity, Virus Load, Prior
793 Dengue Antibodies, and Their Relationship to Birth Outcomes. *Clin Infect Dis*
794 2017; 65:877-83.
- 795 29-Brown JA, Singh G, Acklin JA, Lee S, Duehr JE, Chokola AN, et al. Dengue
796 Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy.
797 *Immunit*. 2019; 50:751-62.
- 798 30- Zimmerman MG, Wrammert J, Suthar MS. Cross-Reactive Antibodies
799 during Zika Virus Infection: Protection, Pathogenesis, and Placental Seeding.
800 *Cell Host Microbe* 2020; 27:14-24.

- 801 31-Regla-Nava JA, Elong Ngonu A, Viramontes KM, Huynh AT, Wang YT,
802 Nguyen AT, et al. Cross-reactive Dengue virus-specific CD8+ T cells protect
803 against Zika virus during pregnancy. *Nat Commun* 2018; 9:3042.
- 804 32-Reynolds CJ, Suleyman OM, Ortega-Prieto AM, Skelton JK, Bonnesoeur P,
805 Blohm A, et al. T cell immunity to Zika virus targets immunodominant
806 epitopes that show cross-reactivity with other Flaviviruses. *Sci Rep.*
807 2018;8(1):672.
- 808 33-Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the
809 control of T cell homeostasis. *Semin Immunol* 2012;24:209-17. Review.
- 810 34-Cellerai C, Perreau M, Rozot V, Bellutti Enders F, Pantaleo G, Harari A.
811 Proliferation capacity and cytotoxic activity are mediated by functionally and
812 phenotypically distinct virus-specific CD8 T cells defined by interleukin-
813 7R{alpha} (CD127) and perforin expression. *J Virol* 2010;84(8):3868-78.
- 814 35-Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective
815 expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give
816 rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003;4:1191-8.
- 817 36-Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE,
818 Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on
819 virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined
820 memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol*
821 2006; 80:3532-40.
- 822 37-Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, et
823 al. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in
824 HIV-infected individuals. *J Immunol* 2005;174(5):2900-9.
- 825 38- van Leeuwen EM, de Bree GJ, Remmerswaal EB, Yong SL, Tesselaar K, ten
826 Berge IJ, van Lier RA. IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes
827 functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells. *Blood.*
828 2005;106:2091-8.
- 829 39-Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression
830 inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T
831 reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
- 832 40- Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et
833 al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil
834 and Mexico. *Cell* 2017;169(4):597-609.

835 41-Andrade P, Gimblet-Ochieng C, Modirian F, Collins M, Cárdenas M,
836 Katzelnick LC, et al. Impact of pre-existing dengue immunity on human
837 antibody and memory B cell responses to Zika. *Nat Commun* 2019; 10:938-
838 50.

839 42-Fernandez E, Dejnirattisai W, Cao B, Scheaffer SM, Supasa P, Wongwiwat W,
840 et al. Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic
841 activity against Zika virus infection. *Nat Immunol* 2017; 18:1261-9.

842 43-Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et
843 al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika
844 virus infection. *Science* 2016;353(6301):823-6.

845 44- Swanstrom JA, Plante JA, Plante KS, Young EF, McGowan E, Gallichotte
846 EN, et al. Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies
847 Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *mBio* 2016;
848 7(4). pii: e01123-16.

849 45-Wang Q, Yang H, Liu X, Dai L, Ma T, Qi J, et al. Molecular determinants of
850 human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika
851 virus. *Sci Transl Med* 2016; 8:369ra179.

852 46- Moreno GK, Newman CM, Koenig MR, Mohns MS, Weiler AM, Rybarczyk
853 S, et al. Long-term protection of rhesus macaques from Zika virus reinfection.
854 *J Virol* 2019; pii: JVI.01881-19.

855 47-Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith ARY, Goo L, et al. Broadly
856 Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral
857 Serotype. *Cell Rep* 2016;16:1485-91.

858 48- Larocca RA, Abbink P, Peron JP, Zanutto PM, Iampietro MJ, Badamchi-
859 Zadeh A, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* 2016;
860 536:474-8

861 49- Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Bin Cao, Fox JM, Bombardi RG, et al.
862 Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal
863 disease in mice. *Nature* 2016; 540:443-7.

864 50- Henderson AD, Aubry M, Kama M, Vanhomwegen J, Teissier A, Mariteragi-
865 Helle T, et al. Zika seroprevalence declines and neutralizing antibodies wane
866 in adults following outbreaks in French Polynesia and Fiji. *Elife* 2020;9. pii:
867 e48460.

- 868 51- Grifoni A, Pham J, Sidney J, O'Rourke PH, Paul S, Peters B, et al. Prior Dengue
869 Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *J Virol*
870 2017; 91. pii: e01469-17.
- 871 52-Ricciardi MJ, Magnani DM, Grifoni A, Kwon YC, Gutman MJ, Grubaugh ND,
872 et al. Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection
873 of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL. *PLoS*
874 *Negl Trop Dis.* 2017; 11:e0006000.
- 875 53-Lai L, Rouphael N, Xu Y, Natrajan MS, Beck A, Hart M, et al. Innate, T-, and
876 B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients. *Clin Infect Dis* 2018; 66:1-
877 10.
- 878 54-Huang H, Li S, Zhang Y, Han X, Jia B, Liu H, et al. CD8+ T Cell Immune
879 Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. *J Virol*
880 2017; 91: e00900-17.
- 881 55-Pardy RD, Rajah MM, Condotta SA, Taylor NG, Sagan SM, Richer MJ.
882 Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel
883 CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathog*
884 2017;13(2):e1006184.
- 885 56-Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al.
886 Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus
887 Infection in Mice. *Cell Host Microbe* 2017;21: 35-46.
- 888 57-Wen J, Tang WW, Sheets N, Ellison J, Sette A, Kim K, Shresta S. Identification
889 of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for
890 dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. *Nat Microbiol* 2017; 2: 17036.
- 891 58-Manangeeswaran M, Ireland DD, Verthelyi D. Zika (PRVABC59) Infection Is
892 Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of
893 Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. *PLoS Pathog* 2016;12:e1006004.
- 894 59-Jurado KA, Yockey LJ, Wong PW, Lee S, Huttner AJ, Iwasaki A. Antiviral CD8
895 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat Microbiol* 2018
896 3:141-7.
- 897 60- Koblischke M, Stiasny K, Aberle SW, Malafa S, Tsouchnikas G, Schwaiger J,
898 et al. Structural Influence on the Dominance of Virus-Specific CD4 T Cell
899 Epitopes in Zika Virus Infection. *Front Immunol* 2018 9:1196-1206.
- 900 61-Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, Kolla RV, De Silva AD, de Silva AM, et al.
901 Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T

902 cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*
903 2015;112:E4256-63.

904 62-Patil VS, Madrigal A, Schmiedel BJ, Clarke J, O'Rourke P, de Silva AD, et al.
905 Precursors of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes identified by single-cell
906 transcriptome analysis. *Sci Immunol* 2018;3. pii: eaan8664.

907 63-Tian Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, et al. Unique
908 phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-
909 expressing CD45RA. *Nat Commun* 2017;8:1473-85.

910 64- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al.
911 Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic,
912 Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1232-9.

913 65-Brazil. Ministry of Health of Brazil. Health Surveillance Department. Zika
914 Virus in Brazil : the SUS response [electronic resource] / Ministry of Health
915 of Brazil, Health Surveillance Department. – Brasilia: Ministry of Health of
916 Brazil, 2017.

917 66- Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES,
918 Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for
919 dengue diagnosis. *J Clin Virol* 1999; 14:183-9.

920 67-Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van
921 Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel
922 NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a
923 multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill* 2016; 21.
924 pii: 30426.

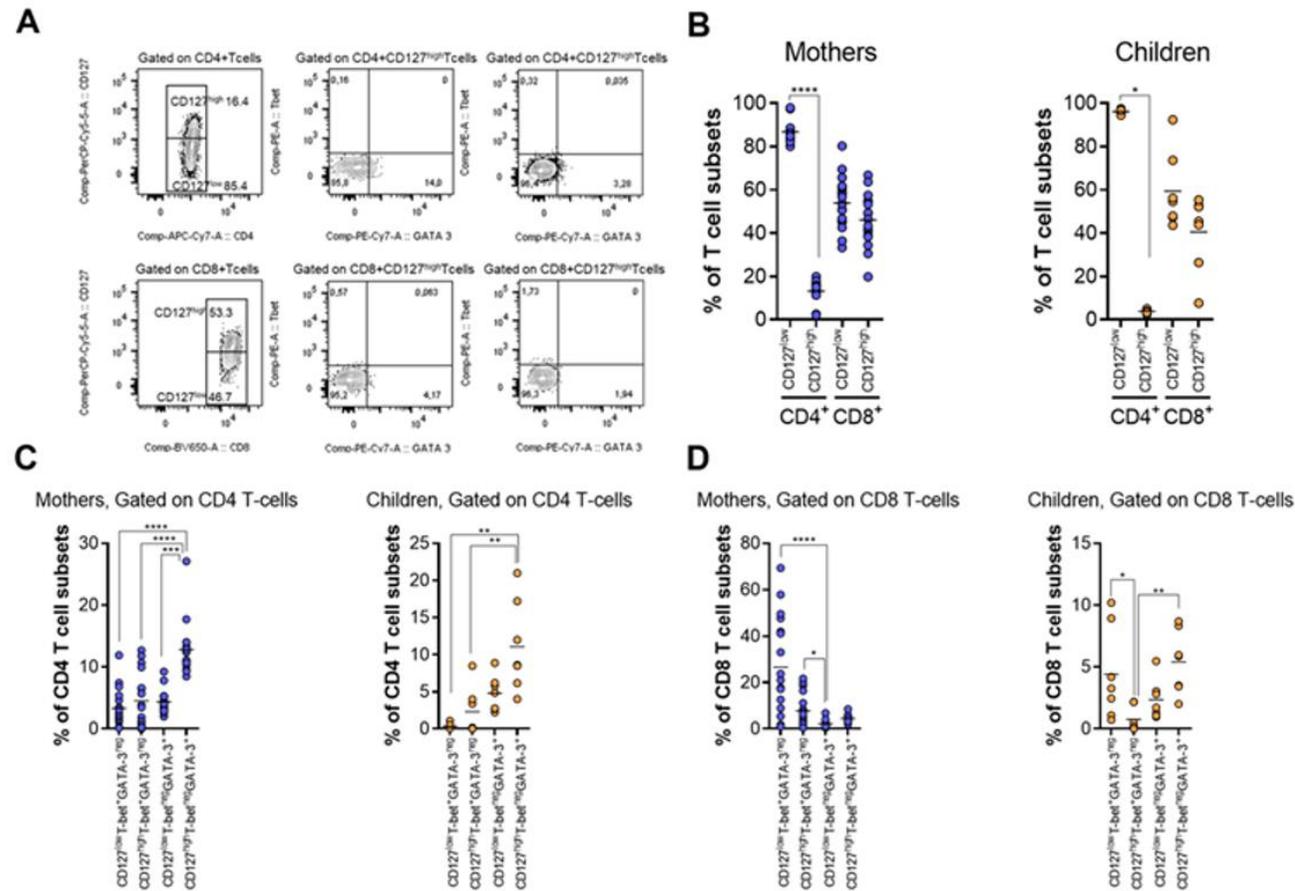
925 68- Grifoni A, Tian Y, Sette A, Weiskopf D. Transcriptomic immune profiles of
926 human flavivirus-specific T-cell responses. *Immunology*. 2020;160(1):3-9.

927 69- Grifoni A, Voic H, Dhanda SK, Kidd CK, Brien JD, Buus S et al. T Cell
928 Responses Induced by Attenuated Flavivirus Vaccination Are Specific and
929 Show Limited Cross-Reactivity with Other Flavivirus Species. *J Virol*.
930 2020;94(10):e00089-20.

931 70-Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, Grifoni A, Diamond MS, Sette A, et al.
932 Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on
933 Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLoS Curr*.
934 2016;8:ecurrents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b.

- 935 71- Paul S, Sidney J, Sette A, Peters B. TepiTool: A Pipeline for Computational
936 Prediction of T Cell Epitope Candidates. *Curr Protoc Immunol.*
937 2016;114:18.19.1-18.19.24.
- 938 72-Dhanda SK, Mahajan S, Paul S, Yan Z, Kim H, Jespersen MC et al. IEDB-AR:
939 immune epitope database-analysis resource in 2019. *Nucleic Acids Res.*
940 2019;47(W1):W502-W506.
- 941 73-Paul S, Lindestam Arlehamn CS, Scriba TJ, Dillon MB, Oseroff C, Hinz D et
942 al. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class
943 II restricted T cell epitopes. *J Immunol Methods.* 2015;422:28-34.
- 944 74-Paul S, Weiskopf D, Angelo MA, Sidney J, Peters B, Sette A. HLA class I alleles
945 are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and
946 immunogenicity. *J Immunol.* 2013;191(12):5831-5839.

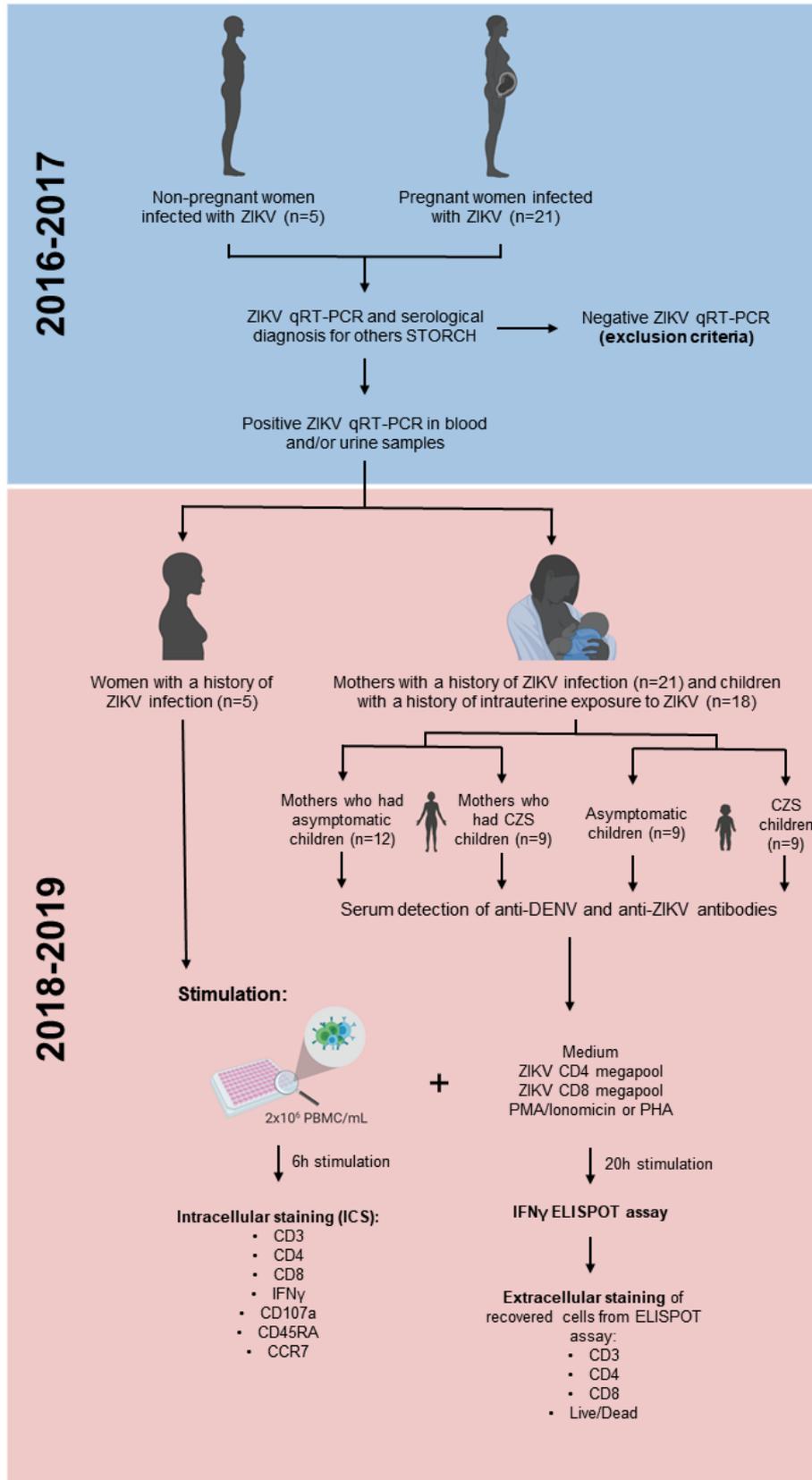
Fig 1



947

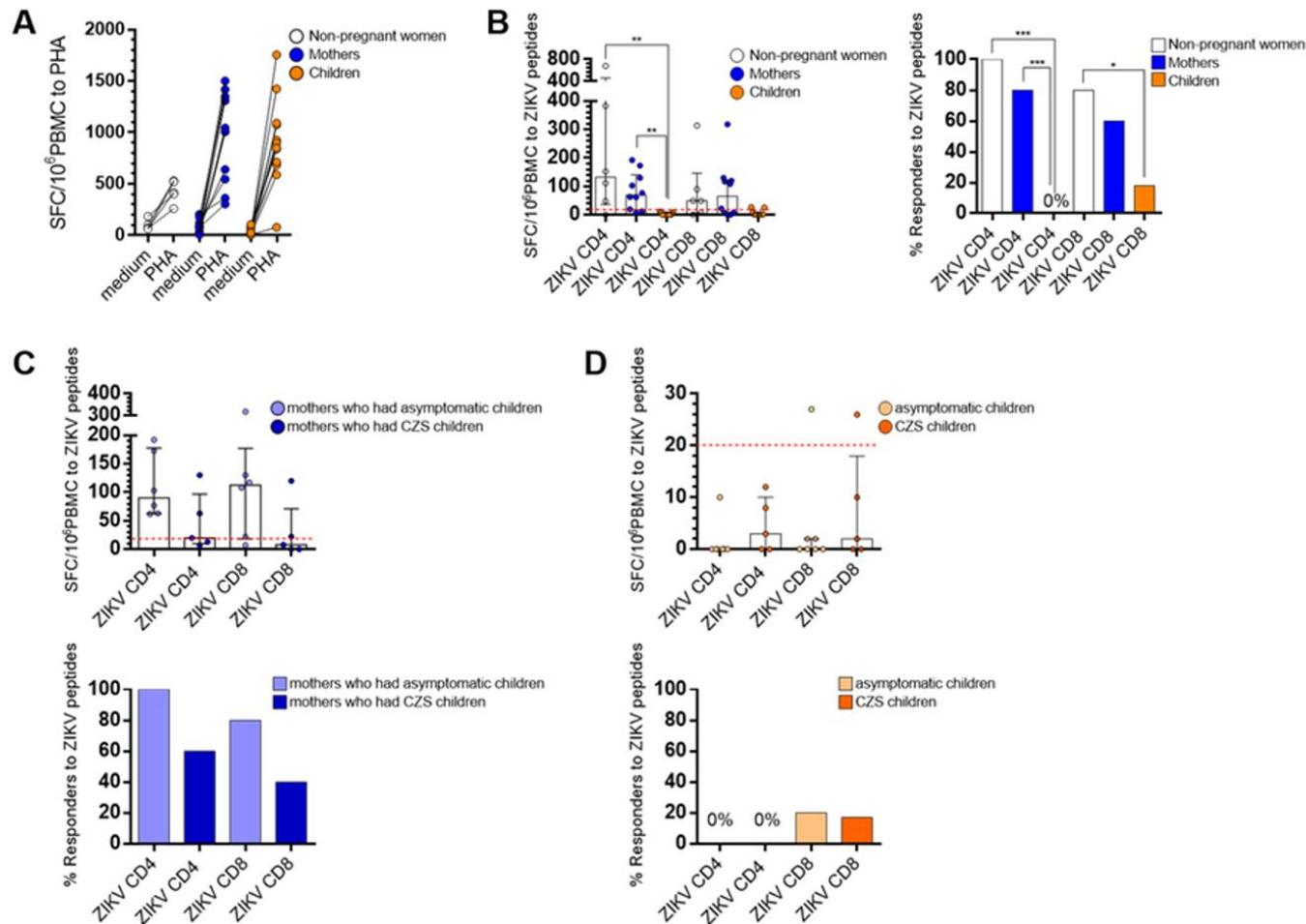
948 **Fig 1: Differential polarization of CD127high effector/memory T cells in donors with a history of ZIKV infection.** CD127, and T-
 949 bet and GATA-3 cells were measured by cellular staining in T cells from ZIKV donors. (A) Representative flow cytometry profile showing that the
 950 CD127 identified two distinct populations of T cells, i.e., CD127low, and CD127high. Polychromatic flow cytometry assay combining T-bet, GATA-

951 3 and CD127, together with CD4 and CD8. **(B)** Each dot represents the frequency of CD127^{low}, and CD127^{high} on CD4 as well as CD8 T cell
952 subsets. Data are expressed as mean for each cohort and each data point represent a single donor (n = 17 and 7 for each cohort, respectively).
953 Statistical differences were tested using Wilcoxon matched pairs signed rank test. Shown is the distribution of CD127 and T-bet and/or GATA-3
954 that were ascribed to the nine subpopulations in CD4 T-cell **(C)** and **(D)** CD8 T-cell population performed for each cohort donors. For all panels,
955 data are expressed as mean each data point represent a single donor. Statistical differences were tested using one-way analysis of variance
956 (ANOVA) and Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test. Bars represent mean, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.



957

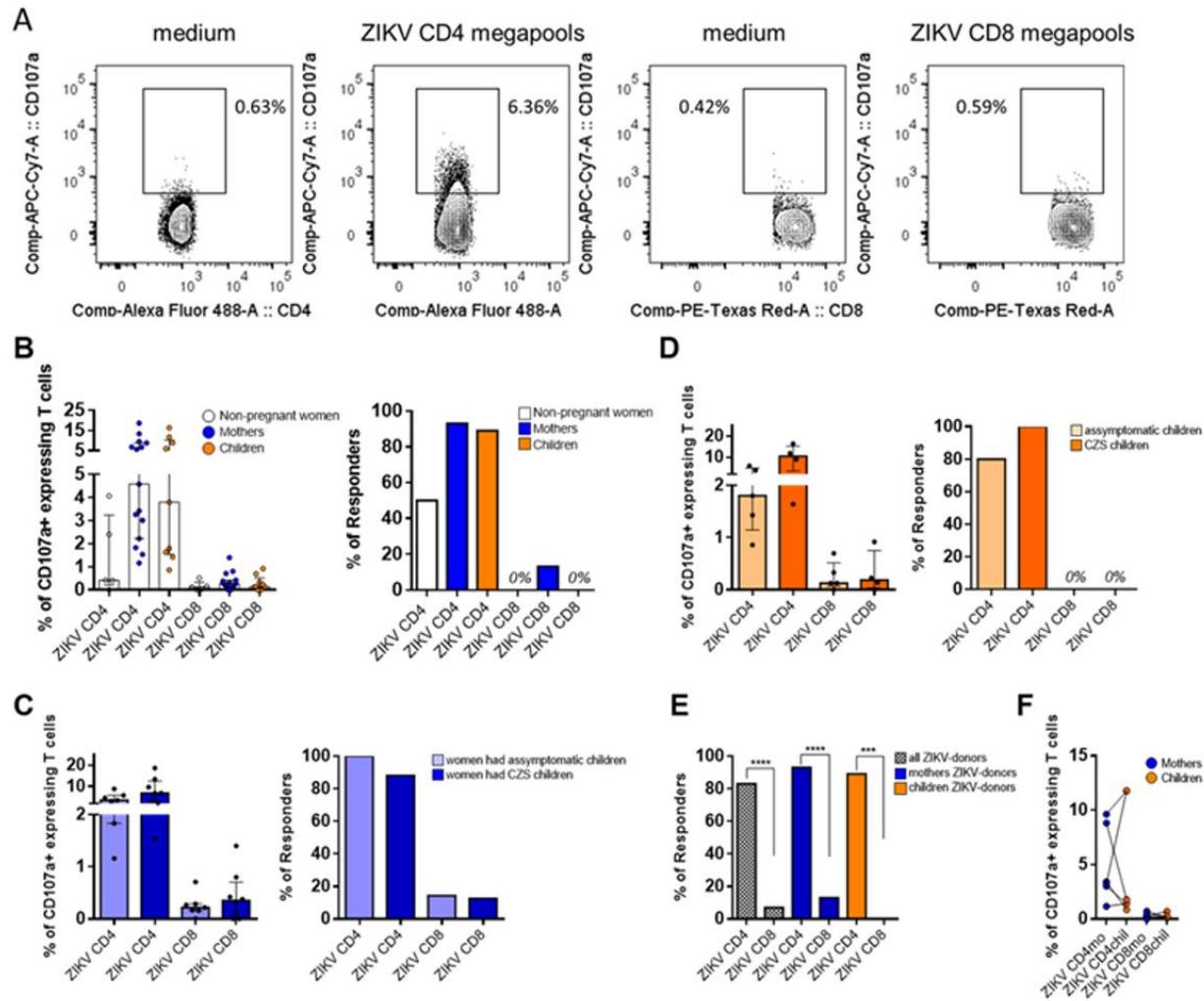
958 **Fig 2: The experimental design used in this study.**



959
960
961
962
963

Fig 3: Ex vivo reactivity to ZIKV-derived peptides in donors with a history of ZIKV infection. T-cell response to by ELISPOT ex vivo experiments are shown for women (from non-pregnant women infected with ZIKV, white, n = 5), mothers (from pregnant mothers infected with ZIKV, blue, n = 10) and children (from children born to mothers infected with ZIKV during pregnancy, orange, n = 11) with a history of ZIKV infection. In (A), T-cell response to PHA stimulation and in (B) the magnitude of CD4 and CD8 T cell reactivity to ZIKV megapools is expressed

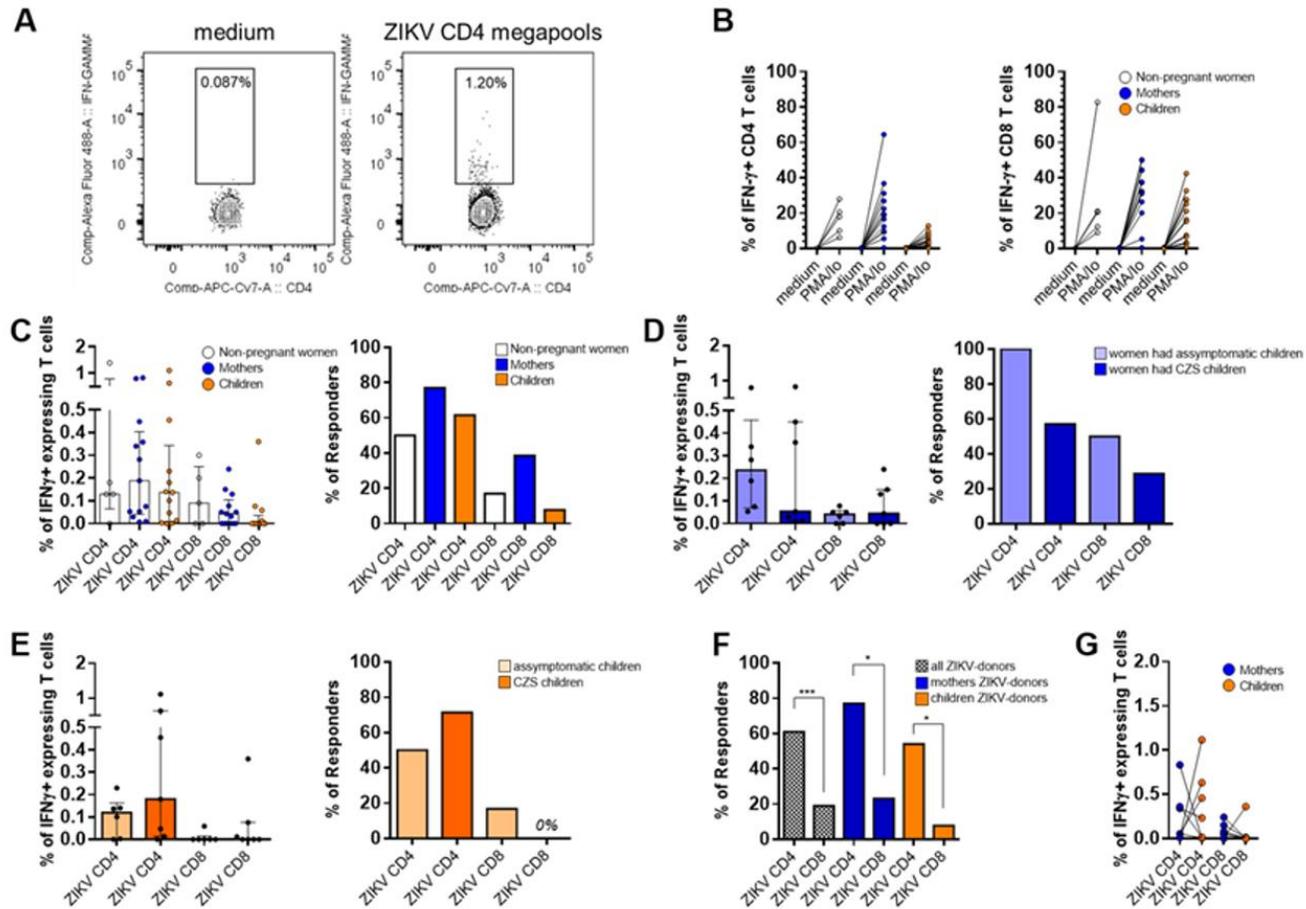
964 as medians and interquartile range (25th and 75th percentiles). Donors were considered “Responders” if the net SFC/10⁶ PBMC after ZIKV
965 peptides was 20 after 20h of in vitro stimulation. (C) CD4 and CD8 T cell reactivity to a ZIKV megapools are shown among mothers who had
966 asymptomatic children (light blue) compared with those had CZS children (dark blue). (D) CD4 and CD8 T cell reactivity to a ZIKV megapools
967 are shown in among children grouped in asymptomatic children (light orange) compared with CZS children (dark orange). Responses were
968 expressed as the number of IFN- γ -secreting cells per 10⁶ PBMC. Statistical differences were tested using one-way analysis of variance (ANOVA)
969 and Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test. Bars represent median with interquartile range. Statistical significance for
970 differences in frequency of “Responders” was performed using a Fisher’s exact test. *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.



971
972
973
974

Fig 4: Degranulation activity of T cells from donors with a history with ZIKV infection after ZIKV peptides in vitro stimulation. (A) Gating strategy to the flow cytometry profiles of the degranulation activity of CD4 and CD8 T cells measured by CD107a mobilization after stimulation with ZIKV-derived peptides are shown in a representative of one of the women (from non-pregnant women infected with ZIKV, white,

975 n = 5), mothers (from pregnant mothers infected with ZIKV, blue, n = 15) and children (from children born to mothers infected with ZIKV during
976 pregnancy, orange, n = 9) with a history of ZIKV infection. **(B)** Cumulative data (medians and interquartile range) of the proportion of CD107a+
977 cells among CD4 and CD8 T cells after Ag-specific stimulation. Regarding the criteria of positivity of the assay or “Responder”, the background in
978 the unstimulated controls was subtracted to ZIKV peptides conditions and the responder was considered those had 2-times more CD107a-positive
979 cells after subtraction of the background. **(C)** CD4 and CD8 T cell reactivity to a ZIKV megapools are shown among mothers who had asymptomatic
980 children (light blue) compared with those had CZS children (dark blue). **(D)** CD4 and CD8 T cell reactivity to a ZIKV megapools are shown in
981 among asymptomatic children (light orange) compared with CZS children (dark orange). **(E)** Frequency of responders were performed from all
982 (dashed white, n = 29), mothers (blue, n = 15) and children (orange, n = 9) with a history of ZIKV infection to the ZIKV CD4 or CD8 peptides. **(F)**
983 The frequencies of ZIKV-specific IFN- γ -positive CD4+ and CD8+ cells were compared between the mother-child pairs (tested pairs n = 6). The p
984 values were calculated using the paired t-test. The magnitude of responses is expressed medians and interquartile range, and statistical analyses
985 were performed with Mann-Whitney U test. Statistical significance for differences in frequency of responders was performed using a Fisher test.
986 Asterisks indicate significant differences (*p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).
987

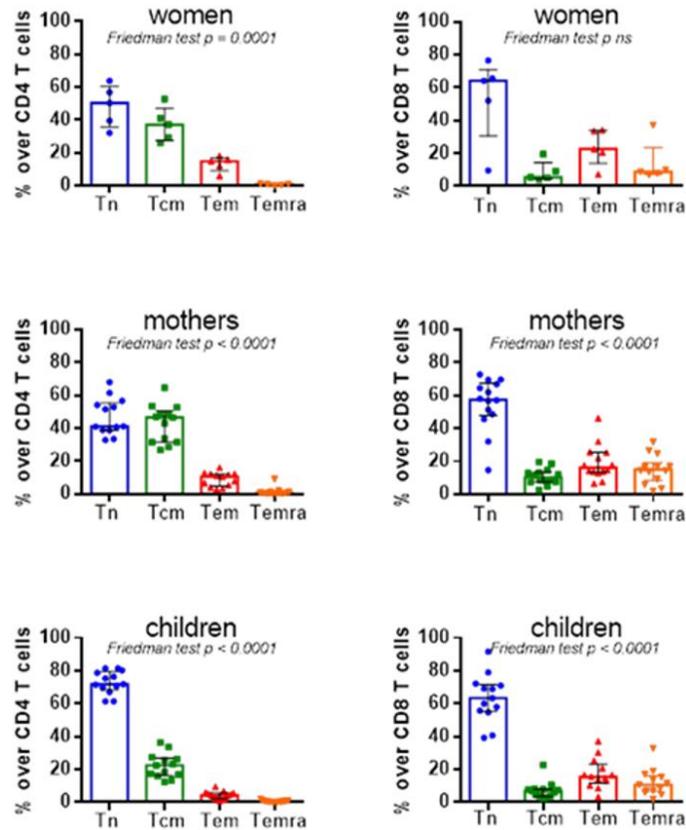


988

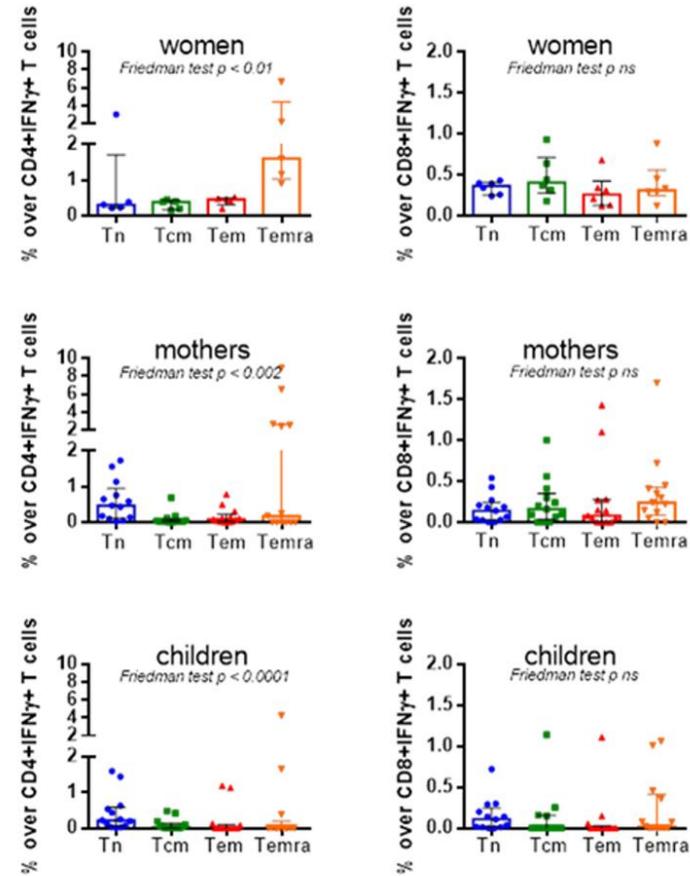
989 **Fig 5: Ex vivo reactivity with IFN- γ production of donors with a history with ZIKV infection to CD4 and CD8 ZIKV peptides.**
 990 CD4 and CD8 ZIKV-restricted responses in women (from non-pregnant women infected with ZIKV, white, n = 5) and mothers (from pregnant
 991 mothers infected with ZIKV, blue, n = 13) and children (from children born to mothers infected with ZIKV during pregnancy, orange, n = 13) with
 992 a history of ZIKV infection after 6-h of in vitro stimulation. (A) Gating strategy to the flow cytometry plots identifies IFN- γ -producing ZIKV-

993 specific T cells. **(B)** Each data point represents the response of a single donor tested with the PMA + io and **(C-E)** two different sets of 2 protein
994 pools, ZIKV CD4 peptides and ZIKV CD8 peptides. **(C)** Magnitude of CD4 and CD8 responses and frequency of responders (right) were performed
995 from women, mothers, and children donors to the ZIKV CD4 or CD8 peptides. **(D-E)** Each group is further divided in asymptomatic or CZS. **(D)**
996 Magnitude of CD4 and CD8 responses (left) and frequency of responders (right) were performed from mothers who had asymptomatic children
997 (light blue, n = 6) and those who had children with SCZ (dark blue, n = 7) to the ZIKV CD4 or CD8 peptides. **(E)** Magnitude of CD4 and CD8
998 responses (left) and frequency of responders (right) were performed from asymptomatic children (light orange, n = 6) and CZS children (dark
999 orange, n = 7) to the ZIKV CD4 or CD8 peptides. **(F)** Frequency of responders were performed from all (dashed white, n = 31), mothers (blue, n =
1000 13) and children (orange, n = 13) donors to the ZIKV CD4 or CD8 peptides. **(G)** The frequencies of ZIKV-specific IFN- γ -positive CD4+ and CD8+
1001 cells were compared between the mother-child pairs (tested pairs n = 7). The p values were calculated using the paired t-test. The magnitude of
1002 responses is expressed medians and interquartile range, and statistical analyses were performed with Mann-Whitney U test. Statistical
1003 significance for differences in frequency of responders was performed using a Fisher test. Asterisks indicate significant differences (*p < 0.05,
1004 ***p < 0.001, ****p < 0.0001).
1005

A



B



1006

1007

1008

1009

Fig 6. Subpopulations of specific memory from ZIKV donors with a history of ZIKV infection. (A) Percentage of unspecific CD4 and CD8 T cell subsets (naive T cells [Tn]: CD45RA+CCR7+; central memory [Tcm]: CD45RA–CCR7+; effector memory [Tem]: CD45RA–CCR7– and, effector memory RA T cells [Temra]: CD45RA+CCR7–) gated in unstimulated cells from women (from non-pregnant women infected with

1010 ZIKV), mothers (from pregnant mothers infected with ZIKV) and children (from children born to mothers infected with ZIKV during pregnancy)
1011 with a history of ZIKV. **(B)** Profile of ZIKV IFN- γ + CD4+ and ZIKV IFN- γ + CD8+ T cells after ZIKV megapools stimulation. Data are expressed
1012 as median \pm the interquartile range for each cohort (n = 5-13 in both panels). Differences between T cell subsets among cohorts was analyzed
1013 using a Friedman test. Each data point represents a single donor determination. Asterisks indicate significant differences (*p < 0.05, ***p < 0.001,
1014 ****p < 0.0001) among frequency of T cell subsets.

1015 **Supporting information**

1016

1017 **Supplementary Table 1. Antibodies used in BD FACS ARIA IIu flow**
 1018 **cytometer.**

1019

Target Molecule	Clone	Company	Catalog #
IFN- γ	4S.B3	eBioscience	11-7319-82
CCR7	Go43H7	Biolegend	353220
CD3	UCHT1	BD Bioscience	557943
CD4	RPA-T4	eBioscience	47004942
CD45RA	HI100	eBioscience	48045842
CD8	RPA-T8	Biolegend	301092
CD127	A019D5	Biolegend	351322
T-bet	4B10	BD Bioscience	561265
Gata-3	L50-823	BD Bioscience	560405
Live/dead		Molecular Probes	L34955
CD107a	H4A3	Biolegend	328630

1020

Artigo 3: Badolato-Corrêa et al. (submetido).

Detecção de epítomos lineares de células B do ZIKV capazes de se ligar a IgG em doadores imunes ao ZIKV

Entre os flavivírus humanos patogênicos, DENV e ZIKV são os mais relacionados entre si, com identidade de sequência de aminoácidos variando de 55,1% a 56,3%. Essa estreita relação antigênica representa um desafio importante principalmente para o desenvolvimento de vacinas, diagnóstico diferencial e vigilância destes dois arbovírus. Sendo assim, tivemos *como objetivo prever, sintetizar e validar epítomos lineares de linfócitos B das regiões NS1, NS5 e E do genoma do ZIKV e avaliar sua capacidade de ligação às IgG de doadores com histórico de infecção por ZIKV ou DENV e pacientes agudos com DENV.*

Para isso, em colaboração com Dr. Rodrigo Nunes, as sequências das proteínas E (YP_009227198.1), NS1 (YP_009227199.1) e NS5 (YP_009227205.1) foram consultadas do site da NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) para a predição de epítomos lineares de linfócitos B. Foram obtidos 22 epítomos promissores, utilizando a combinação de dois algoritmos de previsão do banco de dados de epítomos imunes (IEDB): BepiPred 1.0 e previsão de acessibilidade de superfície EMINI (<http://www.iedb.org/>). Para avaliar o grau de conservação dos peptídeos do ZIKV, as sequências foram comparadas à proteínas homólogas presentes em outros flavivírus (<https://www.uniprot.org/>). Com objetivo de validar epítomos de linfócitos B capazes de distinguir as infecções por ZIKV e DENV experimentalmente, sintetizamos cinco dos 22 epítomos E₍₁₅₈₋₁₇₁₎, E₍₃₆₀₋₃₆₇₎, NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ e NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎, com menores graus de conservação entre as proteínas de ZIKV e DENV. Pela análise de modelagem molecular demonstramos o local de exposição dos cinco epítomos, o que poderia favorecer o reconhecimento por seu ligante.

Iniciamos a avaliação por ELISA da reatividade dos cinco epítomos E₍₁₅₈₋₁₇₁₎, E₍₃₆₀₋₃₆₇₎, NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ e NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎ se ligarem as IgG presentes nas amostras de soro de doadores com histórico de infecção pelo ZIKV há 2- 3 anos e doadores imunes a DENV ou pacientes infectados pelo DENV nas epidemias de 2007, 2008 e 2010, períodos nos quais ZIKV não circulava.

Dentre os resultados obtidos, 25% dos doadores imunes ao ZIKV responderam ao peptídeo NS1₍₈₋₁₅₎, enquanto apenas 5,6% dos doadores DENV-agudos/imunes responderam a esse mesmo peptídeo. A frequência de respostas ao peptídeo NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ foi de 15% no ZIKV-imunes e 5,6% no DENV-agudos/imunes. A frequência dos respondedores ao peptídeo NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎ foi semelhante entre os grupos. Entre os DENV-agudos/imunes, 5,6% e 11,1% reconheceram os peptídeos ZIKV E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ ou E₍₃₆₀₋₃₆₇₎, respectivamente. Mas, nenhum ou 5,6% dos ZIKV-imunes reconheceram peptídeos ZIKV E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ ou E₍₃₆₀₋₃₆₇₎, respectivamente. Em relação a magnitude da reatividade, apenas o peptídeo NS1₍₈₋₁₅₎ foi mais reconhecido entre os ZIKV-imunes em comparação com os DENV-agudos/imunes.

1 **Recognition of linear ZIKV B cell epitopes by IgG**
2 **antibodies from donors with a history of ZIKV**
3 **infection**

4

5 Jessica Badolato-Corrêa da Silva^{1*}, Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva^{2*},
6 Fabiana Rabe Carvalho³, Juan Camilo Sánchez Arcila¹, Monique da Rocha
7 Queiroz Lima¹, Andréa Alice da Silva³, Silvia Maria Baeta Cavalcanti⁴, Patrícia
8 Cristina da Costa Neves², Elzinandes Leal de Azeredo¹, Rivaldo Venâncio da
9 Cunha^{5,6}, Luiz José de Souza⁷, Claudete Aparecida Araújo Cardoso^{3,8}, Josué da
10 Costa Lima Junior⁹ and Luzia Maria de-Oliveira-Pinto¹

11

12 ¹Laboratory of Viral Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, RJ 21040-900, Brazil.

13 ²Laboratory of Monoclonal Antibodies Technology, Institute of Immunobiology
14 Technology, Fundação Oswaldo Cruz, RJ 21040-900, Brazil.

15 ³Multiuser Laboratory for Research in Nephrology and Medical Science, School of
16 Medicine, Universidade Federal Fluminense, RJ 24.033-900, Brazil

17 ⁴Laboratory of Virological Diagnosis, Biomedical Institute, Universidade Federal
18 Fluminense, RJ 24.110-130, Brazil

19 ⁵Medical Clinic Department, Universidade Federal Mato Grosso do Sul, MS 79070-900,
20 Brazil.

21 ⁶ Fundação Oswaldo Cruz, RJ 21040-900, Brazil.

22 ⁷Reference Center for Immune Infectious Diseases, RJ 28025-496, Brazil

23 ⁸Department of Maternal and Child, School of Medicine, Universidade Federal
24 Fluminense, RJ 24.033-900, Brazil

25 ⁹Laboratory of Immunoparasitology, Fundação Oswaldo Cruz, RJ 21040-900, Brazil.

26

27 *These authors contributed equally.

28 Correspondence: lpinto@ioc.fiocruz.br

29 **Abstract**

30

31 **Background.** The recent epidemic of the Zika virus (ZIKV) has challenged
32 existing laboratory diagnostic standards, due to the high cross-reactivity among
33 flaviviruses. In an attempt to contribute in this regard, we predicted, generated,
34 and evaluated linear B cell epitopes of the non-structural (NS) 1, NS5 and
35 envelope (E) viral regions of the ZIKV genome and evaluated their ability to bind
36 to IgG antibodies from donors with a history of ZIKV or DENV infection, and acute
37 DENV patients. **Methods.** Firstly, we screened ZIKV NS1, NS5 and E viral
38 proteins sequences were against predicted linear B-cell epitopes. The most
39 promising sequences were included in conservation analysis to avoid cross-
40 reactivity with other flaviviruses. We tested serum, in a peptide-based ELISA for
41 epitope screening, from 20 ZIKV-immune donors and 18 DENV-acute/immune
42 donors to quantify IgG responses against 5 predicted linear B-cell epitopes of
43 NS1, NS5, and E viral proteins. **Results.** Among the 22 potential linear B-cell
44 epitopes identified, five epitopes specific from ZIKV [NS1(8-15), NS1(188-196),
45 NS5(245-258), E(158-171), and E(360-367)] were selected to test a novel anti-
46 ZIKV ELISA. Interestingly, NS1(8-15) peptide was more recognized in ZIKV-
47 immune donors than DENV-acute/immune donors. However, among ZIKV-
48 immune donors, the magnitude of the anti-NS(8-15) IgG responses did not
49 differentiate ZIKV-immune donors according to their children's clinical outcomes.

50 **Conclusion.** The specific-reactivity of linear B-cell NS1(8-15) IgG provides a first
51 step towards the design of a ZIKV-specific serological assay based on the binding
52 of total IgG antibodies to the solid-phase.

53

54 **Keywords.** Zika virus; Dengue virus; epitopes; antibody

55

56 Introduction

57 The genus *Flavivirus* of the *Flaviviridae* family consists of more than 70
58 members, which are responsible for a spectrum of human and animal diseases,
59 such as dengue (DENV), and Zika virus (ZIKV) [1], both considered arthropod-
60 borne flavivirus [2]. The annual onus of DENV has risen to an estimated 3.6 billion
61 people at risk for infection, 400 million new infections, and 100 million new
62 symptomatic cases annually [1]. The emergence of ZIKV in dengue-endemic
63 regions creates potentially alarming scenarios [3-5]. ZIKV was discovered in 1947
64 [6], was thus not considered to be a significant human pathogen for 60 years until
65 large scale outbreaks started in 2007 in the Pacific Islands, and during the 2015–
66 2016 outbreak in Latin America, including Brazil [7]. Many regions in the Americas
67 have recently experienced simultaneous outbreaks of DENV, and ZIKV induced
68 diseases [8]. In urban environments, both viruses share common human hosts
69 and *Aedes aegypti* as primarily mosquito vectors [9]. Furthermore, sexual [10]
70 and blood transfusion transmission were reported [11].

71 Similar to DENV, most of the ZIKV-infected people are asymptomatic or
72 develop an indistinguishable self-limiting febrile disease, headache, nausea,
73 myalgia, arthralgia, and rash [12]. The rash, frequently observed in zika can be
74 indistinguishable from that observed in dengue; thus, testing for both viruses in
75 acute symptomatic cases is necessary in an area of cocirculation [13]. DENV can
76 cause severe neurological and hemorrhagic disease [14]. On the other hand,
77 ZIKV can cause unusually high numbers of Guillain–Barré syndrome (GBS) in
78 adults and congenital abnormalities, as microcephaly, in fetuses and some other
79 severe abnormalities in newborn infants have been associated with a congenital
80 ZIKV infection, called congenital Zika syndrome (CZS) [15-19].

81 The DENV and ZIKV are a positive-sense single-stranded enveloped RNA
82 virus. The genome encodes a polyprotein processed into three structural proteins
83 (the capsid [C], pre membrane [prM], and the envelope [E] protein) and seven
84 nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [20]. There
85 are four dengue virus (DENV) serotypes (DENV1–4). The amino acid sequences
86 of DENV strains within a serotype are approximately 98.1% to 99.0% identical,
87 and the four DENV serotypes share 68.7% to 78.1% identity [21]. ZIKV strains

88 exist as Asian and African lineages with $\leq 11.7\%$ of nucleotide divergence
89 representing a single serotype [22]. Among pathogenic human flaviviruses,
90 DENV and ZIKV are most closely related to each other, with 55.1% to 56.3%
91 amino acid sequence identity [23]. Therefore, DENV and ZIKV share a close
92 antigenic relationship, and this characteristic poses an important challenge in
93 understanding protection and pathogenesis, complicates vaccine development
94 efforts, slows accurate diagnosis and surveillance for both viruses, with higher
95 impact in areas where flavivirus are endemic or Japanese encephalitis and yellow
96 fever vaccination are common.

97 In February 2016, the World Health Organization declared the Zika
98 epidemic, a public health emergency of international concern. It was determined
99 the importance of developing a reliable and accessible diagnostic test, with the
100 highest priority given to pregnant women [13]. Although, the detection of viral
101 RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) is crucial
102 during acute infection. ZIKV is detectable only briefly during acute illness [24].
103 However, the efficiency of molecular testing for the diagnosis of acute infection is
104 limited because the symptomatic proportion ranged from 27% to 50%, indicating
105 that most infections are asymptomatic or mildly symptomatic [25]. Serological test
106 is the most applied method for diagnosing both recent and past infections.
107 Currently, antibody tests have high cross-reactivity between the surface proteins
108 of ZIKV and other flaviviruses, particularly DENV. A study of 9 Thai patients with
109 documented recent DENV infections found all sera were cross-reactive with
110 ZIKV, including when tested using neutralization tests, in the absence of current
111 or prior ZIKV infection [26]. Assessment of teratological risk during pregnancy
112 and investigations of the prevalence and incidence of infections also require
113 serological tests after the resolution of the viremia [16].

114 Here, ZIKV-specific linear B cell epitopes of the NS1, NS5 and E regions
115 of the ZIKV genome were predicted, synthesized, and evaluated for their ability
116 to bind to IgG antibodies from donors with a history of ZIKV infection, donors
117 previously diagnosed with DENV and others with acute DENV infection.

118

119 **Material and Methods**

120

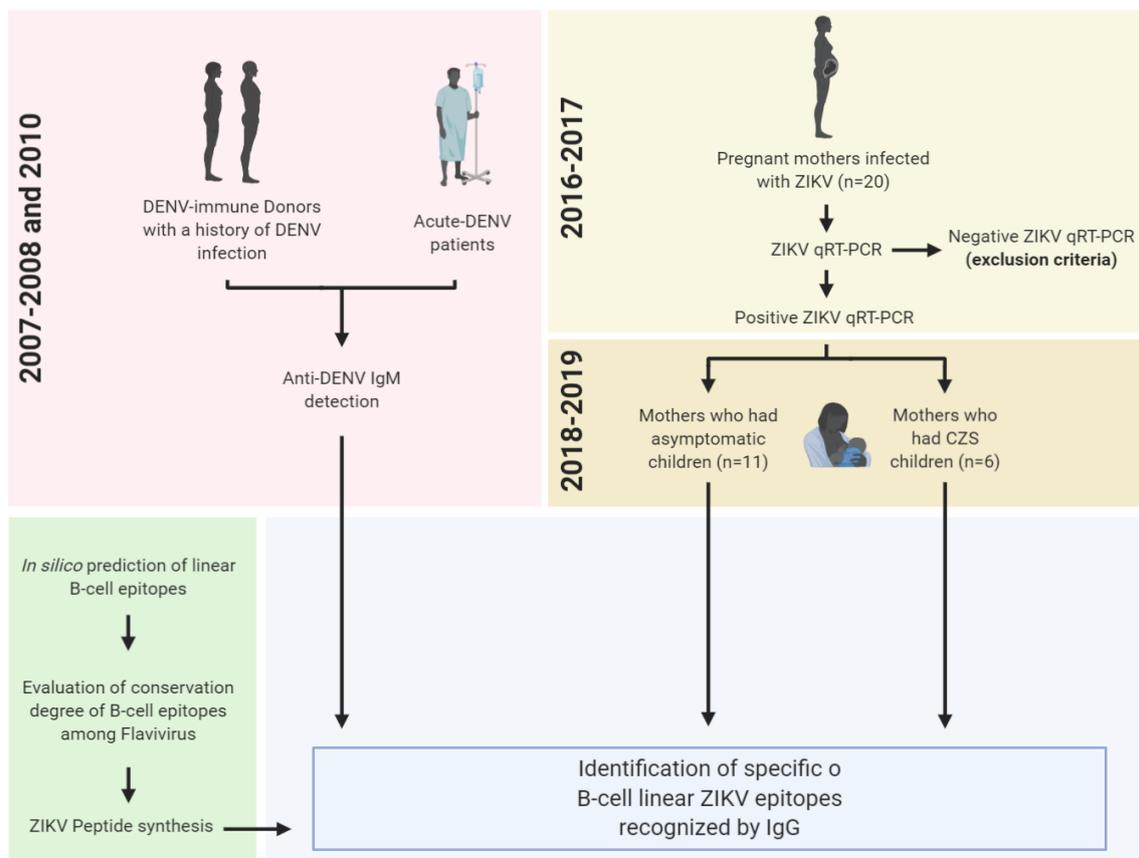
121 Donors and Serum collection

122 Serum specimens were collected from 20 women donors (27 [21 – 33]
123 years old) (median [25% - 75% interquartile range]) with confirmed ZIKV infection
124 who reported rash during pregnancy during the ZIKV Public Health Emergency
125 of National Concern in Brazil period between December 2015 and May 2017.
126 From 2018 to 2019, 10 mL of samples were obtained after peripheral blood
127 venipuncture. The samples were provided with 39 (38 - 40) months (median [25%
128 - 75% interquartile range]) after the first sampling. Patients were enrolled in the
129 study upon admission into the Exanthematic Diseases Unit at the Hospital
130 Universitário Antonio Pedro of the Universidade Federal Fluminense
131 (HUAP/UFF) located in Niteroi, Rio de Janeiro (Brazil).

132 Laboratory evidence for ZIKV infection during pregnancy was based on
133 mother's positive RT-qPCR test results on blood and/or urine samples, done at
134 the Central Public Health Laboratories of Rio de Janeiro State (Laboratórios
135 Centrais de Saúde Pública, LACEN, RJ, Brazil) and confirmed by Multiuser
136 Laboratory for Research Support in Nephrology and Medical Science (LAMAP,
137 UFF, Brazil) [24], performed in the period recommended by the Brazilian Minister
138 of Health [27], as shown in [Figure 1](#).

139 The patients who tested positive with a qRT-PCR for other arboviruses as
140 Chikungunya and Dengue, or women with a positive test to syphilis,
141 toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, and HIV infection, were excluded from
142 the study. All serology tests were performed by the Service of Clinical Pathology
143 (HUAP, UFF Brazil). Previous exposure to DENV was detected by the presence
144 of DENV-specific IgG titers [28] in 70% of the group, while the ZIKV exposed was
145 confirmed by the detection of ZIKV-specific IgG titers [29] in 85% of them,
146 performed by commercial tests (Panbio® Dengue IgG Capture ELISA, cat.
147 01PE10, and EUROIMMUN anti-Zika virus ELISA IgG, cat. EI 2668-9601 G,
148 respectively).

149 Moreover, serum specimens were collected from 18 donors with a history
 150 of DENV infection and acute-phase DENV-patients from 2007, 2008, and 2010
 151 DENV outbreaks (56% female with 33 [25.5 – 46.8] years old) (median [25% -
 152 75% interquartile range]). Patients were recruited at Reference Center for
 153 Immune Infectious Diseases (Centro de Referência de Doenças Imuno-
 154 infecciosas, CRDI) at Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, and at Federal
 155 University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul,
 156 UFMS), Mato Grosso do Sul, Brazil. In these patients, DENV infection was
 157 confirmed by anti-DENV enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-IgM
 158 (Panbio® Dengue IgM Capture ELISA, cat. 01PE20) (Figure 1). Acute DENV-
 159 patients typically developed high grade fever suddenly, usually lasts 2–7 days
 160 and is often accompanied by facial flushing, rash, generalized body ache,
 161 myalgia, arthralgia, and headache. Anorexia, nausea, and vomiting were
 162 common. All specimens were aliquoted and stored at -80°C until use.



163

164 **Figure 1.** Schematic drawing of the experimental development strategy.

165

166 Study approval

167 The study was performed according to the recommendations of the
168 Brazilian National Ethics Committee from the Brazilian Health Ministry and was
169 approved with certified number CAAE: 56913416.9.0000.5243 and the Oswaldo
170 Cruz Foundation number 0111/00.

171

172 Sequence data of Zika virus's proteins

173 To predict B-cell linear epitopes, the entire sequences of ZIKV's Envelope
174 protein (NCBI YP_009227198.1) and nonstructural proteins, NS1 (NCBI:
175 YP_009227199.1) and NS5 (NCBI YP_009227205.1), were downloaded from the
176 NCBI website (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) and used for analyses.

177

178 *In silico* prediction of linear B-cell epitopes

179 To predict linear B-cell epitopes on the entire sequence of the ZIKV's
180 proteins, we used a combination of two prediction algorithms from the immune
181 epitope database (IEDB): BepiPred 1.0 and EMINI Surface Accessibility
182 prediction (<http://www.iedb.org/>). BepiPred predicts the location of linear B-cell
183 epitopes using a combination of a hidden Markov model and incorporates
184 propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure
185 prediction [30]. The positions of the linear B-cell epitopes are predicted to be
186 located at the residues with the highest scores. Therefore, the BepiPred score
187 represents the average of the scores of at least nine consecutive amino acids
188 above the cut-off (0.35), and the sequences with higher mean values were
189 chosen as potential linear epitopes. The Emini surface accessibility (ESA) was
190 used to evaluate the probability of predicted linear B-cell epitopes to be exposed
191 on the surface of the protein. This approach calculates the surface accessibility
192 of hexapeptides, and values greater than 1.0 indicate an increased probability of
193 being found on the surface [31]. Sequences with more than 8 aminoacids and
194 BepiPred score above 0.35 and ESA score above 1.0 were considered potential
195 linear B-cell epitopes in regions that could be accessed by naturally acquired
196 antibodies.

197 Evaluation of conservation degree of B-cell epitopes among Flavivirus

198 To evaluate the degree of conservation of ZIKV predicted epitopes among
199 Flavivirus, the sequences were compared to their Flavivirus homologous
200 proteins. The similarity between sequences was determined calculating the ratio
201 of identical number amino acids/total amino acids in each sequence. The
202 Flavivirus protein sequences were obtained from UniProt Knowledgebase
203 (<https://www.uniprot.org/>), as illustrated in [Table 1](#).

204 After *in silico* analysis, sequences predicted as linear B-cell epitopes were
205 synthesized by fluorenylmethoxycarbonyl (F-moc) solid-phase chemistry [32]
206 (GenOne Biotechnologies, Brazil). Analytical chromatography of the peptide
207 demonstrated a purity of >95%, and mass spectrometric analysis also indicated
208 estimated masses corresponding to the molecular masses of selected epitopes.

Table 1. Identification of Flavivirus used to determine the conservation degree of predicted B-cell epitopes.

Identification	Virus	Strain	Uniprot ID
DENV1	Dengue virus 1	<i>Brazil/97-11/1997</i>	P27909
DENV2	Dengue virus 2	<i>Peru/IQT2913/1996</i>	Q9WDA6
DENV3	Dengue virus 3	<i>Sri Lanka/1266/2000</i>	Q6YMS4
DENV4	Dengue virus 4	<i>Dominica/814669/1981</i>	P09866
YFV	Yellow fever virus	<i>Ghana/Asibi/1927</i>	Q6DV88
WNV	West Nile virus	<i>Strain NY-99</i>	Q9Q6P4
SLEV	St Louis encephalitis virus	<i>MS1-77</i>	P09732
JEV	Japanese encephalitis virus	<i>SA-14</i>	P27395
ILHV	Ilheus virus	<i>ILHV</i>	Q32ZD7

209

210 Enzyme-linked immunosorbent assays

211 Briefly, 3 µg/mL of ZIKV peptides were added on the Maxicorp 96-well plates
212 (Nunc, Rochester, NY) following overnight incubation at 4°C. After, plates were
213 washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) and blocked with
214 PBS-Tween containing 5% low fat dry milk, 3% fetal bovine serum (FBS), and
215 0.05% bovine serum albumin (BSA) (blocking buffer), for 1h at 37°C. Sera diluted
216 1:5 in PBS-Tween containing 2.5% no fat dry milk, 1.5% fetal bovine serum
217 (FBS), and 0.025% bovine serum albumin (BSA) (dilution buffer) were added in
218 triplicate to the wells and allowed to react for 2h min at 37 °C. After four washes
219 with PBS-Tween, bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated
220 rabbit anti-human (Sigma) for 30 min at room temperature followed by staining

221 with o-phenylenediamine and hydrogen peroxide for 15 min and stop the reaction
222 with sulfuric acid 2N (H₂SO₄). The color intensity of the enzymatic reactions was
223 determined photometrically at 492 nm using ELISA reader (Spectramax,
224 Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Specific reactivity was obtained by
225 subtraction of the averaged OD value to PBS alone from the averaged OD value
226 of all samples individually. Subjects were classified as positive IgG responders to
227 a peptide if the OD was greater than the average plus twice the standard
228 deviation of the group with a history of DENV infection.

229

230 Statistical analysis

231 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad
232 Software Inc., La Jolla, California, US). Differences in medians for the study
233 population data were tested by non-parametric Mann-Whitney test when
234 appropriate. Differences in proportions or qualitative variables were evaluated by
235 Fisher's exact test. P values less than 0.05 were considered statistically
236 significant. Peptide sensitivity, specificity, and confidence intervals were obtained
237 using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, US).

238

239 **Results**

240

241 **B cell epitope prediction**

242 The ZIKV sequences of Envelop protein (E protein), Nonstructural protein
 243 1 (NS1) and Nonstructural protein 5 (NS5) were analyzed by Bepipred and EMINI
 244 Surface Accessibility prediction algorithms to predict linear B-cell epitopes of
 245 ZIKV. As showed in [Table 2](#), 22 sequences were predicted as linear B-cell
 246 epitopes on studied proteins: five epitopes in E protein, eight epitopes in NS1 and
 247 nine epitopes in NS5.

Table 2. Predicted B-cell linear epitopes on Zika virus's proteins.

Protein	Epitope	Sequence	Lenght	BepiPred score	Emini score
E	E ₍₇₅₋₈₉₎	PTQGEAYLDKQSDTQ	15	0.940	2.394
	E ₍₁₅₈₋₁₇₁₎	EDRAKVEVTPNSPR	14	1.338	1.791
	E ₍₁₈₅₋₁₉₂₎	DCEPRTGL	8	0.618	1.586
	E ₍₂₂₅₋₂₃₄₎	ADTGTPHWNN	10	1.456	2.108
	E ₍₃₆₀₋₃₆₇₎	VITESTEN	8	0.939	2.041
NS1	NS1 ₍₈₋₁₅₎	FSKKETRC	8	0.614	3.283
	NS1 ₍₃₂₋₄₁₎	YKYHPDSPRR	10	1.095	3.187
	NS1 ₍₉₅₋₁₀₇₎	NPMWRGPQRLPVP	13	0.815	1.295
	NS1 ₍₁₈₈₋₁₉₆₎	VKGREAAHS	9	0.739	1.165
	NS1 ₍₂₀₃₋₂₁₀₎	ESEKNDTW	8	0.725	3.646
	NS1 ₍₂₄₈₋₂₇₀₎	AGPLSHHNTREGYRTQVKGPWHS	23	0.809	1.698
	NS1 ₍₂₉₀₋₃₀₆₎	TCGTRGPSLRSTTASGR	17	0.922	1.011
	NS1 ₍₃₃₅₋₃₄₄₎	IRPRKEPESN	10	1.127	4.833
NS5	NS5 ₍₁₀₀₋₁₁₄₎	VRGYTKGGPGHEEPM	15	1.241	1.211
	NS5 ₍₂₄₅₋₂₅₈₎	DGPRRPVKYEEDVN	14	0.995	2.340
	NS5 ₍₃₄₃₋₃₅₅₎	AMTDTPYGGQQRV	13	0.810	1.237
	NS5 ₍₃₆₀₋₃₇₂₎	VDTRVPDPQEGTR	13	1.400	1.685
	NS5 ₍₄₅₈₋₄₇₁₎	KREKKQGEFGKAKG	14	0.994	2.757
	NS5 ₍₅₉₇₋₆₀₅₎	RQDQRGSGQ	9	0.997	2.367
	NS5 ₍₆₈₈₋₇₀₅₎	KVRKDTQEWKPSTGWSNW	18	1.203	2.273
	NS5 ₍₈₂₄₋₈₃₆₎	DHMEDKTPVTKWT	13	1.043	1.646
	NS5 ₍₈₅₆₋₈₆₄₎	RPRTTWAEN	9	0.722	1.350

In table, the prediction score represents the average of scores for all amino acids within the region with prediction values above the cut-offs chosen for significance. The Cut-off values to BepiPred and EMINI Surface Accessibility were 0.5 and 1.0, respectively.

248

249 **Evaluation of predicted epitope conservancy among Flavivirus**

250 ZIKV's E, NS1, and NS5 are conserved proteins among Flavivirus, sharing
 251 identities levels ranging from 42% to 70% ([Table 3](#)). E protein presented more
 252 non-conserved epitopes among Flavivirus, than NS1 and NS5 ([Table 3](#)).
 253 Searching for epitopes able to distinguish ZIKV and DENV infections, among five
 254 predicted linear B-cell epitopes in Envelope protein, the sequences E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ and

255 E₍₃₆₀₋₃₆₇₎ showed to be highly specific to ZIKV, presenting conservation degree
 256 minor than 30%, while the epitope E₍₂₂₅₋₂₃₄₎ shared 40% of identity with DENV1
 257 and DENV2 and 60% of identity with DENV3 and DENV4. Besides, despite NS1
 258 is the major serological target to diagnosis of Flavivirus, among 16 predicted
 259 epitopes in ZIKV's NS proteins, only the epitopes NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ and
 260 NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎ showed to be specific of ZIKV, sharing minor than 50% of identity with
 261 DENV (Table 3).

262

Table 3. Degree of conservation of predicted B-cell epitopes between Flavivirus

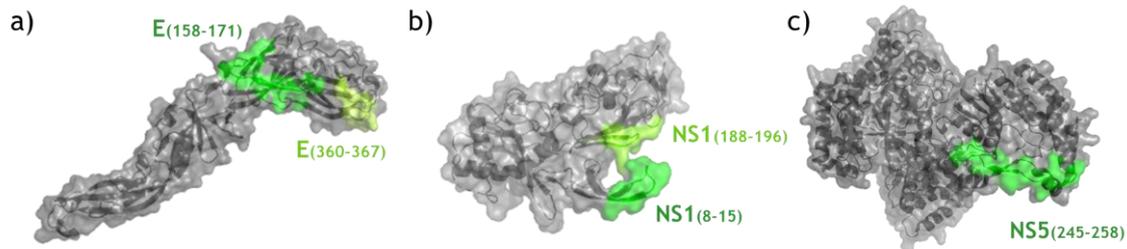
ZIKV's protein	ZIKV's epitopes	Degree of conservation (%)								
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	YFV	WNV	SLEV	JEV	ILHV
E	E protein	58	54	58	56	42	54	55	55	54
	E ₍₇₅₋₈₉₎	53	47	53	60	33	53	53	47	47
	E₍₁₅₈₋₁₇₁₎	29	29	21	29	7	21	21	50	36
	E ₍₁₈₅₋₁₉₂₎	88	75	75	75	25	75	63	88	63
	E ₍₂₂₅₋₂₃₄₎	40	40	60	60	10	30	40	30	30
	E₍₃₆₀₋₃₆₇₎	13	25	25	13	0	25	25	25	25
NS1	NS1 protein	55	55	55	54	48	56	56	57	56
	NS1₍₈₋₁₅₎	25	38	38	50	50	50	25	50	25
	NS1 ₍₃₂₋₄₁₎	60	50	60	60	40	50	50	60	70
	NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎	33	33	44	33	44	56	56	67	78
	NS1 ₍₂₀₃₋₂₁₀₎	88	75	63	75	56	75	75	75	50
	NS1 ₍₂₄₈₋₂₇₀₎	61	65	65	65	48	61	65	65	74
	NS1 ₍₂₉₀₋₃₀₆₎	65	76	76	71	59	59	71	65	76
	NS1 ₍₃₃₅₋₃₄₄₎	70	70	60	60	70	40	60	40	40
NS5	NS5 protein	65	65	66	67	60	70	70	68	70
	NS5 ₍₁₀₀₋₁₁₄₎	87	80	93	87	60	93	80	93	93
	NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎	33	27	33	33	27	40	53	60	47
	NS5 ₍₃₄₃₋₃₅₅₎	92	92	92	92	92	92	92	92	92
	NS5 ₍₃₆₀₋₃₇₂₎	54	62	69	69	69	54	46	46	62
	NS5 ₍₄₅₈₋₄₇₁₎	93	93	93	86	86	93	93	93	93
	NS5 ₍₅₉₇₋₆₀₅₎	89	89	89	89	89	89	89	89	89
	NS5 ₍₆₈₈₋₇₀₅₎	61	67	61	67	67	83	83	78	89
	NS5 ₍₈₂₄₋₈₃₆₎	54	62	69	54	54	69	46	62	77
NS5 ₍₈₅₆₋₈₆₄₎	56	56	56	56	44	78	78	78	78	

The peptides highlighted in bold were those selected for screening using the ELISA methodology. Similarity percentages greater than 75% are represented in red, between 50 and 75% are represented in orange, between 25 and 49% are represented in medium blue and similarities below 25% are represented in light blue. DENV1, dengue virus 1. DENV2, dengue virus 2. DENV3, dengue virus 3. DENV4, dengue virus 4. YFV, Yellow fever virus. WNV, West Nile virus. SLEV, St Louis encephalitis virus. JEV, Japanese encephalitis virus. ILHV, Ilheus virus. On table, lines "E protein", "NS1 protein" and "NS5 protein" represents the conservation degree among ZIKA virus proteins and respective proteins from other Flavivirus.

263

264 Based on these findings and aiming to validate experimentally B-cell
 265 epitopes able to distinguish the exposition to ZIKV and to DENV infections, we
 266 selected the epitopes: E₍₁₅₈₋₁₇₁₎, E₍₃₆₀₋₃₆₇₎, NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ and NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎,
 267 which were non conserved between proteins of ZIKV and DENV (Table 3), to
 268 synthesize.

269 **Figure 2** shows the molecular modeling of the ZIKV E, NS1 and NS5
270 proteins in which the location of the selected specific epitopes is represented,
271 confirming the forecast of the disordered region defined by BepiPred. In addition,
272 it is possible to notice the epitope exposure site, which could favor recognition by
273 its ligand.
274



275
276 **Figure 2.** Visualization of ZIKV's specific predicted epitopes in its 3D monomeric
277 proteins structures. (a) Envelope protein (PDB: 5JHM), (b) NS1 (PDB: 5k6k) and
278 (c) NS5 (PDB: 5M2X). Proteins as represented as gray cartoons and surface, in
279 which predicted continuous B-cell epitopes where highlighted in light and lemon
280 green.

281 Identification of ZIKV-specific B cell linear epitopes recognized by IgG
282 from donors with a history of ZIKV and/or DENV infections.

283 Here, we present data of the reactivity of IgG serum samples binding to
284 NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎, NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎, E₍₁₅₈₋₁₇₁₎, and E₍₃₆₀₋₃₆₇₎ ZIKV's specific epitopes
285 in ZIKV-immune and DENV-acute/immune donors by ELISA.

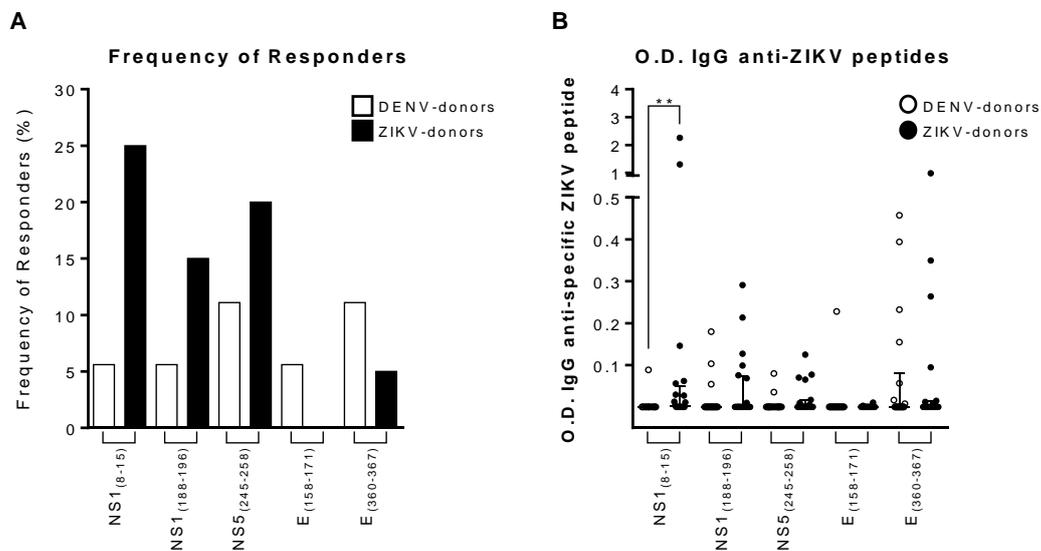
286 Among NS1 peptides, 25% of ZIKV-immune donors were responders to
287 NS1₍₈₋₁₅₎ peptide, while only 5,6% of the donors were responders in DENV-
288 acute/immune group. The frequency of responders to NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ peptide were
289 15% in ZIKV-immune group and 5.6% in DENV-acute/immune group (**Fig 3A**).
290 Within the ZIKV proteome, NS1₍₈₋₁₅₎ and NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎ are the peptides that
291 presented low conservation degrees among 4 DENV serotypes (ranging from
292 25% to 50%) (**Table 3**). Besides that, the NS1₍₈₋₁₅₎ peptide was recognized in
293 ZIKV-immune donors with OD ranged from 0.0 to 2.3 (mean = 0.2 ± 0.6)
294 compared to OD from 0.0 to 0.1 (mean = 0.005 ± 0.02) to DENV-acute/immune

295 donors, with significant differences (Fig 3B). In contrast, no statistical difference
296 was observed for IgG reactivity against ZIKV NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎.

297 Among NS5 peptide, the frequency of responders to NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎ peptides
298 was similar between the groups (Fig 3A). Moreover, no statistical difference was
299 seen for IgG reactivity against NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎ (Fig 3B), despite being intermediary to
300 low level of conservation among 4 DENV serotypes (ranging from 27% to 69%)
301 (Table 3).

302 Only one (5.6%) ZIKV-immune sample and 4 samples (11,1%) from
303 DENV-acute/immune donors recognized ZIKV E peptides, indicating very low
304 levels of seroreactivity to ZIKV E in ZIKV-immune donors, including, E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ or
305 E₍₃₆₀₋₃₆₇₎ (Fig 3A-B). In contrast, these peptides present the lower to intermediary
306 levels of conservation among 4 DENV serotypes (ranging from 13% to 60%)
307 (Table 3).

308



309

310 **Figure 3.** Reactivity of ZIKV-specific linear epitopes for B cells. Identification of
311 specific ZIKV NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎, NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎, E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ and, E₍₃₆₀₋₃₆₇₎ were
312 determined in ZIKV-immune (n = 20) and DENV-acute/immune (n = 18) samples
313 by ELISA for IgG. **(A)** Frequency of total IgG responders to each peptide in the
314 ZIKV-immune and DENV-acute/immune donors. Subjects were considered IgG
315 responders to a peptide if the optical density (OD) was higher than the mean OD
316 plus 2 standard deviations (SD) of 18 DENV-acute/immune donors. **(B)** Detection

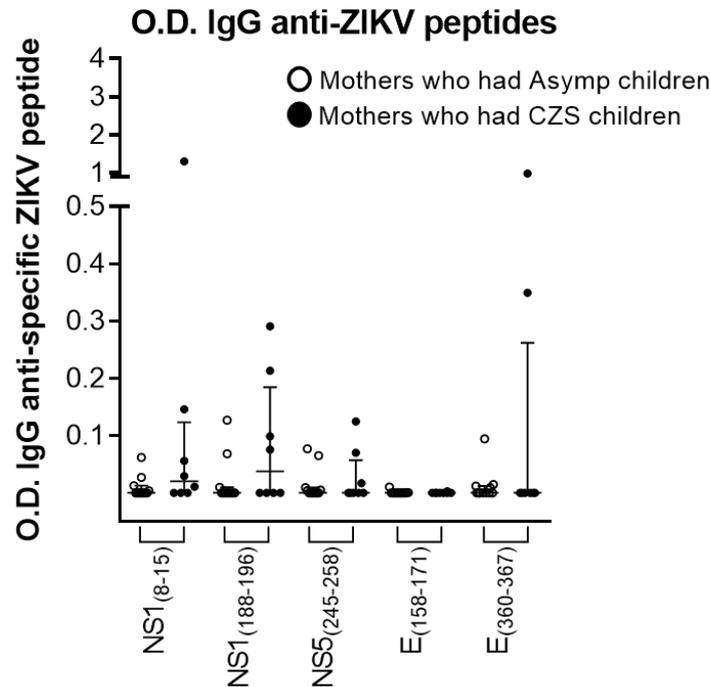
317 of IgG anti- NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎, NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎, E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ and E₍₃₆₀₋₃₆₇₎ peptides in
318 the ZIKV-immune and DENV-acute/immune donors. The difference between
319 frequency of IgG responders to the ZIKV-specific peptides was tested by Fisher's
320 exact test. The *p < 0.05 indicates that the difference among frequency of
321 responders for each peptide. The OD data are expressed as mean values with
322 standard deviation for each ZIKV-specific peptide and each data point represent
323 a single donor. Statistical differences were tested using non-parametric Mann-
324 Whitney test.

325

326 Magnitude of response to mothers' ZIKV-specific peptides
327 according to children's clinical outcome

328 As previously demonstrated, among ZIKV-immune donors, a higher
329 frequency and magnitude of responders was observed for ZIKV-specific NS1₍₈₋₁₅₎
330 peptide. Following the analysis, donors were subdivided by the clinical outcome
331 of children after birth into asymptomatic or affected by congenital Zika syndrome
332 (Figure 1). Infants with microcephaly were evaluated according to Brazil's Ministry
333 of Health protocol [27]. The clinical and laboratory characteristics of these
334 subgroups are described in Supplementary Table 1.

335 Based on the magnitude of response, almost of ZIKV-specific peptides were
336 less recognized in ZIKV-immune mothers who had asymptomatic children
337 compared to ZIKV-immune mothers who had CZS children, despite without
338 significant differences (Fig 4).



339

340 **Figure 4.** Reactivity of ZIKV-specific linear epitopes for B cells. Identification of
 341 specific ZIKV NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎, NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎, E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ and, E₍₃₆₀₋₃₆₇₎ were
 342 determined in ZIKV-immune mothers who had asymptomatic children (n = 11)
 343 and ZIKV-immune mothers who had CZS children (n = 8) samples by ELISA for
 344 IgG. Detection of IgG anti- NS1₍₈₋₁₅₎, NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎, NS5₍₂₄₅₋₂₅₈₎, E₍₁₅₈₋₁₇₁₎ and E₍₃₆₀₋₃₆₇₎
 345 peptides in donors. The *p < 0.05 indicates that the difference among
 346 frequency of responders for each peptide. The OD data are expressed as mean
 347 values with standard deviation for each ZIKV-specific peptide and each data point
 348 represent a single donor. Statistical differences were tested using non-parametric
 349 Mann-Whitney test.

350

351 Discussion

352 In the present study, we evaluated anti-Zika IgG responses in donors with
 353 a historical of ZIKV infection. Since the serum samples from ZIKV donors were
 354 collected in the late convalescent phase, we researched the IgG levels because
 355 they were higher at that time. Recently, in a description of the naturally acquired
 356 antibody response in ZIKV-infected patients, the authors reported that anti-ZIKV

357 IgM could be detected (2–7 days post-illness onset) during the acute phase and
358 peaked at early convalescent phase (10–14 days), before decreasing during the
359 recovery phases (3 months to 1 year). They also observed that ZIKV-specific IgG
360 peaked at early convalescent, persisted at high levels during late recovery and
361 was still detectable one year after the infection. Interestingly, 80% of these
362 patients were negative for anti-DENV IgM in the acute phase, but 75% were
363 detected anti-DENV IgG [33].

364 The possibility of using ZIKV antigens to distinguish ZIKV infections from
365 other flavivirus infections has been demonstrated in previous studies [29, 34-36]
366 and are crucial in vaccine and immunodiagnostic developments [37, 38].
367 Computational studies indicate multiple differential epitopes in validating patient
368 samples, although this remains a challenge [39]. Here, 22 peptides linear from
369 ZIKV E, NS1 and NS5 proteins using *in silico* prediction tools, followed by
370 evaluation of conservation degree of these epitopes among others flavivirus.
371 Results specifically identified 17 epitopes with a conserved degree higher than
372 50% among four serotypes DENV (ranged to 50 to 92%) and five potential ZIKV-
373 specific epitopes with a degree lower than 50% among 4 serotypes DENV
374 (ranged to 19 to 38%). To assess the performance of the identified epitopes, five
375 out of 22 peptides were screened using patient serum samples.

376 Many works have shown the specificity of the NS1 antigen to differentiate
377 between ZIKV and DENV [29, 34, 35, 40, 41]. In our study, 25% of the ZIKV-
378 donor's samples were able to recognize specific ZIKV-peptides NS1₍₈₋₁₅₎ and
379 NS1₍₁₈₈₋₁₉₆₎. We suggest the NS1₍₈₋₁₅₎ specific ZIKV-peptide that differentiated
380 ZIKV-donors from DENV-donors. It shares low to moderate sequence identity
381 (25% to 50%) with the 4 DENV serotypes, it could be conformationally different
382 and, therefore, differentially recognized by specific antibodies for ZIKV- and
383 DENV [39, 42]. However, the NS1₈₋₁₅ specific ZIKV-peptide had a degree of
384 conservation of 50% among the YFV proteome. For that reason, it is necessary
385 to study in the future whether NS1₈₋₁₅ specific ZIKV-peptide could be used to
386 distinguish YFV vaccinated donors from ZIKV donors and will perform in other
387 ZIKV-patient cohorts.

388 Denis and colleagues (2019) produced a recombinant ZIKV-EDIII protein
389 and evaluated its IgG recognition, specificity, and sensitivity in a large cohort of
390 patients. Cross-reactivity of IgG using a large cohort of sera against total DENV
391 or inactivated ZIKV was high (71%), while specificity and sensitivity calculated
392 using representative cohorts reached 90% and 92%, respectively, using the
393 ZEDIII-based ELISA. The authors suggest that the use of the ZEDIII antigen
394 provides a good basis for the development of diagnostic assays [43]. However,
395 our data using ZIKV-specific E peptides were not encouraging.

396 A recent study used a whole-genome phage display library spanning the
397 entire ZIKV genome and a surface plasmon resonance as an unbiased
398 comprehensive analysis of the antibody repertoires in a group of patients with
399 confirmed exposure to the ZIKV donors [44, 45]. The authors observed a
400 remarkably diversity IgG immune repertoire, covering the entire ZIKV polyprotein,
401 increasing ten times between day 0 and day 7 in the serum, highly focused on
402 prM/E, NS1, and NS2B. Also, they observed a maturation of differential affinity
403 with the antibody against the structural protein E of the ZIKV compared to the
404 nonstructural protein NS1. The affinity of the serum antibody with the ZIKV-E
405 protein was inversely correlated with the symptoms of ZIKV disease [46].
406 Considering that there is a remarkably diversified IgG immune repertoire, a weak
407 or lack of IgG binding response by E peptides after a long period of ZIKV infection
408 can be seen in our cohort. Longitudinal studies are required to understand this
409 response dynamics.

410 As the ZIKV-specific NS1₍₈₋₁₅₎ peptide distinguished ZIKV-donors from
411 DENV-donors, both were screened and validated by observing either two groups
412 of women with a history of ZIKV infection during pregnancy, those who had
413 asymptomatic babies and who had babies affected by congenital Zika syndrome
414 (Figure 1). We expected to find a difference in recognition of these epitope in
415 mothers who had congenital Zika syndrome observed. Antibodies of the IgG class
416 are the only ones capable of significantly crossing the maternal placenta to the
417 fetus, protecting to the baby while its humoral response is inefficient. IgG transfer,
418 among other evidence, depends on maternal levels of total IgG and specific
419 antibodies and IgG subclasses. IgG1 and IgG3 are transferred more efficiently
420 across the placenta than IgG2. Furthermore, the transfer of antibodies against

421 viral proteins and antitoxins of the IgG1 subclass occurs more readily [47]. Amrun
422 and colleagues (2019) demonstrated a higher anti-ZIKV IgG1 and IgG3 isotypes
423 at early convalescent for IgG3 and late convalescent for IgG1 by ZIKV patients
424 [33]. Therefore, although there is no difference in recognition of NS1₍₈₋₁₅₎ ZIKV-
425 specific peptide among mothers, it is particularly important to evaluate IgG
426 subclasses in the future.

427 Besides binding assay between peptides and antibodies, additional
428 serological tests should be performed to determine the specificity and neutralizing
429 activity of the anti-ZIKV and anti-DENV antibodies detected in our donors. Amrun
430 and colleagues observed an efficient neutralization capacity of ZIKV from ZIKV
431 patients (71–93%) in early and late convalescent stages, while weak
432 neutralization of anti-ZIKV IgG (37–47%) was seen in late and full recovery
433 stages. Interestingly, plasma from these patients only minimally neutralized
434 DENV, indicating ZIKV specificity [33].

435 Besides the neutralizing activity of the antibodies, the avidity is a well-
436 known concept, referring to the overall binding strength of antibodies to antigens.
437 As described by Fox and colleagues (2006), at the beginning of the infection, IgG
438 antibodies show low avidity for antigens; this gradually increases in the
439 subsequent weeks and months due to the affinity maturation immune process
440 [48]. Thus, authors have been developed an IgG avidity test to discriminate recent
441 ZIKV infection from past DENV infections. For this, they incorporated a step of
442 urea washing in a previously standardized flavivirus multiplex microsphere
443 immunoassay (MIA) test [34]. Furuya and colleagues demonstrated that anti-
444 ZIKV IgM positive specimens had an average ZIKV IgG avidity index of 14.8%,
445 while anti-ZIKV IgM negative but flavivirus MIA and PRNT positive samples had
446 an average Zika IgG avidity index of 34.9%. Specimens positive for dengue
447 antibodies by flavivirus MIA and PRNT had an average dengue IgG avidity index
448 of 68.7%, indicating that the IgG avidity assay accurately distinguished recent
449 ZIKV from past DENV infections in patients who traveled to dengue-endemic
450 regions [49].

451 Overall, this study offers some information about the potential ZIKV-
452 specific linear B-cell epitopes in the human antibody response. In addition, it

453 highlights the importance of using bioinformatics tools as BepiPred 1.0 and EMINI
454 Surface Accessibility prediction to predict linear epitopes with potentials to be
455 screened and validated. Thus, notably, the NS1₍₈₋₁₅₎ peptide was more
456 recognized in ZIKV-immune donors than DENV-acute/immune donors; therefore,
457 these results provide useful information and provide a first of many steps for
458 designing a diagnostic test based on the binding of total IgG antibodies to the
459 solid phase.

460

461 **FUNDING**

462 This investigation was supported by Oswaldo Cruz Foundation/ Oswaldo
463 Cruz Institute (Fiocruz/IOC).

464

465 **ACKNOWLEDGMENTS**

466 The authors thank children and their families that participated in the study,
467 Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências
468 Médicas/LAMAP, Unidade de Pesquisa Clínica/UPC, and Zika Collaborative
469 Group /UFF and, Dr. Remberto Mauricio de la Cruz Vargas Vilte for his for
470 assisting the pregnant women and conducting clinical follow-up of puerperal
471 women at the outpatient clinic.

472

473 **Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted
474 in the absence of any commercial or financial relationships that could be
475 construed as a potential conflict of interest.

476

477 **References**

- 478 [1] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al.
479 The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr
480 25;496(7446):504-7.
- 481 [2] Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*.
482 2016 Jul;22(7):1185-92. Review.
- 483 [3] Perkins TA, Siraj AS, Ruktanonchai CW, Kraemer MU, Tatem AJ. Model-
484 based projections of Zika virus infections in childbearing women in the
485 Americas. *Nat Microbiol*. 2016 Jul 25;1(9):16126.
- 486 [4] Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-
487 borne disease. *N Engl J Med*. 2015 Mar 26;372(13):1231-9.
- 488 [5] Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus
489 Threat. *N Engl J Med*. 2016 Feb 18;374(7):601-4.
- 490 [6] Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological
491 specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952 Sep;46(5):509-20.
- 492 [7] Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth
493 Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016 May
494 19;374(20):1981-7.
- 495 [8] Vogels CBF, Rückert C, Cavany SM, Perkins TA, Ebel GD, Grubaugh ND.
496 Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health
497 concern? *PLoS Biol*. 2019 Jan 22;17(1):e3000130.
- 498 [9] Gardner LM, Bóta A, Gangavarapu K, Kraemer MUG, Grubaugh ND. Inferring
499 the risk factors behind the geographical spread and transmission of Zika in
500 the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Jan 18;12(1):e0006194.
- 501 [10] Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected
502 Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016.
503 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jul 22;65(28):716-7.
- 504 [11] Motta IJ, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, Arruda MB, Dobbin JA,
505 Gonzaga YB, et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet
506 Transfusion. *N Engl J Med*. 2016 Sep 15;375(11):1101-3.

- 507 [12] Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gómez WE, Franco-Paredes C. The
508 arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of
509 dengue, chikungunya, and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis.* 2016
510 May-Jun;14(3):177-9.
- 511 [13] Landry ML, St George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch*
512 *Pathol Lab Med.* 2017 Jan;141(1):60-67.
- 513 [14] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998
514 Jul;11(3):480-96. Review.
- 515 [15] Pan American Health Organization. Reported increase of congenital
516 microcephaly and other central nervous system symptoms. 2016. Accessed
517 on February 02, 2020 at 18:53.
- 518 [16] Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L,
519 Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro.
520 *N Engl J Med.* 2016 Dec 15;375(24):2321-2334.
- 521 [17] van der Linden V, Filho EL, Lins OG, van der Linden A, Aragão Mde F,
522 Brainer-Lima AM, et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis:
523 retrospective case series study. *BMJ.* 2016 Aug 9;354:i3899.
- 524 [18] van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, Júnior HV, Filho EL,
525 et al. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With
526 Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR*
527 *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 Dec 2;65(47):1343-1348.
- 528 [19] Ventura CV, Maia M, Dias N, Ventura LO, Belfort R Jr. Zika: neurological and
529 ocular findings in infant without microcephaly. *Lancet.* 2016 Jun
530 18;387(10037):2502.
- 531 [20] Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et
532 al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015
533 Sep;89(17):8880-96.
- 534 [21] Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, Grifoni A, Diamond MS, Sette A, et al.
535 Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on
536 Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLoS Curr.* 2016 Nov
537 15;8. pii:ecurrents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b.

- 538 [22] Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al.
539 Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the
540 Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1477.
- 541 [23] Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev*
542 *Immunol*. 2018 Apr 26;36:279-308.
- 543 [24] Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al.
544 Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic,
545 Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1232-9.
- 546 [25] Mitchell PK, Mier-Y-Teran-Romero L, Biggerstaff BJ, Delorey MJ, Aubry M,
547 Cao-Lormeau VM, Lozier MJ, Cauchemez S, Johansson MA. Reassessing
548 Serosurvey-Based Estimates of the Symptomatic Proportion of Zika Virus
549 Infections. *Am J Epidemiol*. 2019 Jan 1;188(1):206-213.
- 550 [26] Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J,
551 Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection
552 are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul
553 12;113(28):7852-7.
- 554 [27] Brazil: Ministry of Health. Orientações integradas de vigilância e atenção à
555 saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional.
556 <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/12/orientacoes-integradas-vigilancia-atencao.pdf>. 2017. Accessed on February 15, 2020
557 at 09:10.
- 559 [28] Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES,
560 Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for
561 dengue diagnosis. *J Clin Virol*. 1999 Dec;14(3):183-9.
- 562 [29] Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van
563 Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel
564 NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a
565 multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill*. 2016
566 Dec 15;21(50). pii: 30426.
- 567 [30] Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell
568 epitopes. *Immunome Res*. 2006 Apr 24;2:2.

- 569 [31] Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-
570 neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol.* 1985
571 Sep;55(3):836-9.
- 572 [32] Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank RW. Automated multiple peptide
573 synthesis. *Pept Res.* 1992 Nov-Dec;5(6):315-20.
- 574 [33] Amrun SN, Yee WX, Abu Bakar F, Lee B, Kam YW, Lum FM, et al. Novel
575 differential linear B-cell epitopes to identify Zika and dengue virus infections
576 in patients. *Clin Transl Immunology.* 2019 Jul 26;8(7):e1066.
- 577 [34] Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP 2nd, Kramer LD, et al. A
578 Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis. *EBioMedicine.*
579 2017 Feb;16:136-140.
- 580 [35] Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana
581 JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other
582 flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Aug 1;114(31):8384-8389.
- 583 [36] Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, et al. Diagnosis
584 of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent
585 Assay. *mBio.* 2018 Mar 6;9(2). pii: e00095-18.
- 586 [37] Vaughan K, Greenbaum J, Blythe M, Peters B, Sette A. Meta-analysis of all
587 immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune
588 epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology.
589 *Viral Immunol.* 2010 Jun;23(3):259-84.
- 590 [38] Sun EC, Zhao J, Liu NH, Yang T, Ma JN, Geng HW, et al. Comprehensive
591 mapping of West Nile virus (WNV)- and Japanese encephalitis virus
592 serocomplex-specific linear B-cell epitopes from WNV non-structural protein
593 1. *J Gen Virol.* 2012 Jan;93(Pt 1):50-60.
- 594 [39] Lee AJ, Bhattacharya R, Scheuermann RH, Pickett BE. Identification of
595 diagnostic peptide regions that distinguish Zika virus from related mosquito-
596 borne Flaviviruses. *PLoS One.* 2017 May 31;12(5):e0178199.
- 597 [40] Lee HJ, Cho Y, Kang HJ, Choi H, Han KR, Chong CK, et al. Identification of
598 peptide based B-cell epitopes in Zika virus NS1. *Biochem Biophys Res
599 Commun.* 2018 Nov 10;505(4):1010-1014.

- 600 [41] Freire MCLC, Pol-Fachin L, Coêlho DF, Viana IFT, Magalhães T, Cordeiro
601 MT, et al. Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides
602 Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and
603 Dengue Viruses. *ACS Omega*. 2017 Jul 31;2(7):3913-3920.
- 604 [42] Ramanathan B, Poh CL, Kirk K, McBride WJ, Aaskov J, Grollo L. Synthetic
605 B-Cell Epitopes Eliciting Cross-Neutralizing Antibodies: Strategies for Future
606 Dengue Vaccine. *PLoS One*. 2016 May 25;11(5):e0155900.
- 607 [43] Denis J, Attoumani S, Gravier P, Tenebray B, Garnier A, Briolant S, et al.
608 High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis
609 highlighted by a large human reference panel. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Sep
610 20;13(9):e0007747.
- 611 [44] Khurana S, Suguitan AL Jr, Rivera Y, Simmons CP, Lanzavecchia A,
612 Sallusto F, et al. Antigenic fingerprinting of H5N1 avian influenza using
613 convalescent sera and monoclonal antibodies reveals potential vaccine and
614 diagnostic targets. *PLoS Med*. 2009 Apr 21;6(4):e1000049.
- 615 [45] Fuentes S, Coyle EM, Beeler J, Golding H, Khurana S. Antigenic
616 Fingerprinting following Primary RSV Infection in Young Children Identifies
617 Novel Antigenic Sites and Reveals Unlinked Evolution of Human Antibody
618 Repertoires to Fusion and Attachment Glycoproteins. *PLoS Pathog*. 2016
619 Apr 21;12(4):e1005554.
- 620 [46] Ravichandran S, Hahn M, Belaunzarán-Zamudio PF, Ramos-Castañeda J,
621 Nájera-Cancino G, Caballero-Sosa S, et al. Differential human antibody
622 repertoires following Zika infection and the implications for serodiagnostics
623 and disease outcome. *Nat Commun*. 2019 Apr 26;10(1):1943.
- 624 [47] Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M.
625 IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev
626 Immunol*. 2012;2012:985646.
- 627 [48] Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. Immunoglobulin G avidity in
628 differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus.
629 *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Jan;13(1):33-6.

630 [49] Furuya AKM, Hunt D, George KS, Dupuis AP 2nd, Kramer LD, Shi PY, et al.
 631 Use of the immunoglobulin G avidity assay to differentiate between recent
 632 Zika and past dengue virus infections. Clin Sci (Lond). 2019 Apr
 633 4;133(7):859-867.
 634

Supplementary Table 1. Clinical and laboratorial characteristics of ZIKV-infected pregnant women in the acute phase of infection in 2016 and 2017 outbreaks.

	Clinical outcome of the child	
	Asymptomatic (n=11)	CZS (n=8)
Age (years)^a	26 (21 – 30)	31 (20 – 38)
Gestational trimester at rash onset^b		
1 th	8	57
2 th	50	29
3 th	42	0
Presence of symptoms^b		
Fever	50	29
Headache	42	29
Myalgia	58	14
Arthralgia	50	43
Conjunctival Hyperemia	33	29
Infant outcome at birth^b		
Asymptomatic	100	0
Microcephaly	0	43
CZS	0	100
Neurological abnormalities	0	100

^a Median (25% - 75% interquartile range). ^b %. For the statistical analysis of qualitative variables, chi-square and Fisher's exact test was used. P values less than 0.05 were considered statistically significant. CZS, congenital Zika syndrome

635

Artigo 4: Badolato-Corrêa et al. (submetido)

Papel duplo dos linfócitos T humanos após infecção sequencial ou concomitante por DENV e ZIKV

Neste artigo, buscamos descrever os estudos recentes envolvendo infecção sequencial e coinfeção por DENV e ZIKV, com enfoque na resposta imunológica adaptativa celular mediada por linfócitos T. O enfoque desta revisão bibliográfica é destacar os dados direcionados para a resposta imunológica de linfócitos T específica e de reatividade cruzada disponibilizados na literatura, uma vez que o DENV e o ZIKV apresentam alta similaridade antigênica, podendo induzir papéis ambíguos envolvendo tanto linfócitos T, quanto anticorpos. Essa semelhança estrutural representa um importante desafio na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção e imunopatogênese. Além disso, também representa um desafio para o desenvolvimento de vacinas eficazes e desenvolvimento de testes diagnósticos especialmente em áreas em que as infecções por flavivirus são endêmicas ou a vacinação é preconizada.

Two roles of human T cells in the sequential infection by DENV and/or ZIKV or in the coinfection by DENV and ZIKV

Jessica Badolato-Corrêa da Silva¹, Débora Familiar-Macedo¹, Iury Amancio-Paiva¹ and Luzia Maria de-Oliveira-Pinto¹

¹Viral Immunology Lab, Oswaldo Cruz Foundation, RJ 21040-900, Brazil.

Abstract

Especially in urban environments in Dengue virus (DENV) endemic regions, outbreaks of the Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses, represent a potentially alarming scenario and a serious public health challenge. The three viruses share humans as a vertebrate host and *Aedes aegypti* as the main vector. Additionally, common biological, ecological and economic factors facilitated many regions in the Americas to experience recent simultaneous outbreaks with concomitant infections by two or more of these arboviruses. Despite the clarity of the potential for coinfections, little is known about their consequences for the human host. In this article, *we use DENV and ZIKV to describe the recent data on sequential infection and coinfection, predominantly highlighting the adaptive immune response of T cells.* The summary of these data available in the literature comes to discuss and highlight opportunities for future research. As it is already well known, DENV and ZIKV share a close antigenic relationship, which can lead to possible two opposite roles mediated by antibodies and T cells. This similarity between viruses represents an important challenge for understanding the immunological mechanisms of protection and immunopathogenesis. In addition, it poses a challenge to vaccine development and makes it difficult to diagnose and monitor viruses, especially in areas where flaviviruses are endemic or vaccination is common.

Overview on Dengue virus and Zika virus

Many regions in the Americas have recently experienced simultaneous outbreaks of dengue virus (DENV) and zika virus (ZIKV) induced diseases (1). The genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae* consists of more than 70 members and includes several medically important viruses, such as DENV and ZIKV (2). There is an estimate that 3.6 billion people are at risk of infection by DENV, with 400 million new infections, and 100 million new symptomatic cases annually (2). The emergence of ZIKV in dengue-endemic regions creates a potentially alarming scenario (3–5). ZIKV was first identified in 1947, but was not considered to be a significant human pathogen for 60 years, until large scale outbreaks started in 2007 in the Pacific Islands, followed by French Polynesia outbreak in 2013 and during the 2015–2016 outbreak in Latin America, including Brazil (6). In urban environments, both viruses share common humans hosts and *A. aegypti* as primarily mosquito vectors (7). Furthermore, it was already reported that ZIKV transmission could occur by other routes, such as sexual transmission (8) and blood transfusion (9).

The majority of DENV and ZIKV-infected individuals are asymptomatic or develop an indistinguishable self-limiting febrile disease, with headache, nausea, myalgia, arthralgia, and rash (10). However, DENV has the potential to cause severe neurological and hemorrhagic disease (11), and ZIKV infection has already been associated with Guillain–Barré syndrome (GBS) in adults and congenital abnormalities as microcephaly in fetuses. Moreover, some other severe abnormalities in newborn infants have been associated with a congenital ZIKV infection (12–16).

Both DENV and ZIKV are a positive-sense single stranded enveloped RNA virus. The genome encodes a polyprotein, which is processed into three structural proteins (the capsid [C], premembrane [prM], and the envelope [E] protein) and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (17). There are four dengue virus (DENV) serotypes (DENV1–4). The amino acid sequences of DENV strains within a serotype are approximately 98.1% to 99.0% identical, and the four DENV serotypes share 68.7% to 78.1% identity (18). ZIKV strains exist as Asian and African lineages with 99.2% identical representing a single serotype (19). Among pathogenic human

flaviviruses, DENV and ZIKV are most closely related to each other, with 55.1% to 56.3% amino acid sequence identity (20).

Data reports on DENV/ZIKV coinfection

In addition to Brazil, clinical studies have so far reported human coinfections in countries such as Colombia, New Caledonia, Nicaragua and Haiti (21–24). Our group published data in 2018 on 134 patients suspected of being infected with arbovirus in the acute phase. Of these, 107 confirmed a diagnosis of DENV or ZIKV infection during the 2016 epidemic in the state of Mato Grosso in Brazil. Mono-infection by DENV was detected by viral RNA in 51 tested samples; DENV and ZIKV RNA were detected simultaneously in 18 samples and ZIKV mono-infection was detected by ZIKV RNA in 18 cases. DENV-1 was the predominant infectious serotype among mono- and coinfected patients, followed by DENV-4. The cases of DENV/ZIKV coinfection showed a tendency to present lower values of Cycle Threshold (Ct) by RT-PCR than those observed in mono-infected DENV or ZIKV. While prostration and vomiting were significantly associated with DENV mono-infection, itching and edema were more associated with ZIKV mono-infection. Patients coinfected by DENV/ZIKV presented lower frequency of rash and itching and significantly less headache than patients with DENV mono-infection (25). Later, in 2019, Estofolote and cols. published data on 1,254 patients available in a city located in the northwest region of São Paulo, which is hyper-endemic to dengue. They observed that 12 of these patients were co-infected by DENV and ZIKV and another 274 mono-infected by DENV (26).

Studies have suggested that related arboviruses exhibit a level of cross-protection and that, therefore, prior exposure to one virus generates an immune response during a sequential exposure to a second virus, which could decrease the likelihood of sequential infections (27,28). In the case of co-transmission in a naive individual never exposed to any of the flaviviruses, this individual will not have a pre-existing immune response, leading to a reduced role of the cross-reactivity. Understanding the dynamics of the specific immune response in co-infection and sequential infections by related arboviruses is a challenge that, if

better understood, will help to understand the mechanisms of host protection and pathogenesis and also to facilitate the development of vaccines, specific diagnostic tests and improve epidemiological surveillance, particularly in areas where flaviviruses are endemic or vaccination is common.

Immune response in sequential infections and co-infection by DENV/ZIKV

Humans can acquire dengue more than once in their life, due to the circulation of 4 antigenically distinct serotypes of the virus. While primary infection by any serotypes confers lifelong immunity to the infecting serotype (homologous) (29), epidemiological studies indicate that severe forms of dengue, Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS), often occur in individuals affected by a second infection with a different serotype (heterologous) (30). Immunity can also be cross-protective after exposure to the heterologous serotype, but this protection occurs for only 2 to 3 months after the previous infection (29). After this period, patients with secondary infections appear to change the course of the infection. It has been shown that in these cases, patients' viremia peaks with higher levels, increasing the risk of developing DHF and/or SCD (31).

DENV and ZIKV infection begins on human skin, but viruses must reach the blood and cause viremia for new vector hosts to be infected and thus spread the viral infection to other individuals. The immune response is initially activated at the site of the mosquito bite on the skin, where several sentinel immune cells are present, such as dendritic cells (DCs), Langerhans cells (LCs), macrophages and mast cells (MCs) (32). DCs and macrophages are target cells for infection, and productive or abortive infection by DENV or ZIKV can trigger the activation of innate antiviral immune responses (33,34). The interferon system, comprising type I (IFN- α , β), type II (IFN- γ) and type III interferons (IFN- λ 1-4), is the main mechanism by which the innate immune system defends itself against viral infections (35–37). The type I IFN system is activated a few hours after a viral infection, after recognition of the virus by pattern recognition receptors (PRRs), such as type RLRs (retinoic acid-inducible gene I

(RIG) -I)-like receptors, RLRs) and Toll-like receptors, TLRs. Recognition of viral nucleic acids by these PRRs results in the activation of multiple transcription factors, including interferon regulatory factors (IRFs) and NF- κ B, which cooperate in inducing more IFNs and various other inflammatory cytokines and chemokines, orchestrating innate immune responses and adaptive (38).

Cross-reactivity T-cell immune response in the sequential infections and co-infection by DENV/ZIKV

Most pantropic viruses employ a similar spread strategy. At the inoculation site, virions replicate in tissue macrophages and DCs, which direct the virus to the draining lymph nodes. After a period of viremia mainly associated with monocytes, macrophages or DCs, virions spread to infect other local tissues. DCs are critical for the presentation of antigens to T lymphocytes in lymph nodes, and there is evidence that the processing and presentation of DENV and ZIKV antigens by DCs influence the clinical outcome of the disease (39,40). In addition to their anti-viral effects, IFNs type I and II promote the activation of DCs and the presentation of antigens to establish adaptive immunity mediated by T and B lymphocytes (41,42).

Sabin and colls. demonstrated that long-lasting protective immunity to DENV is a specific serotype since re-exposure to the same serotype 12 months after an initial exposure does not result in disease. However, reexposure with different serotypes at different time intervals leads to a variable degree of heterotypic protection. A reexposure after 3 months of the first infection resulted in complete heterotypic protection (absence of viremia and symptoms); a reexposure between 3 and 12 months did not provide complete heterotypic protection, but was associated with mild dengue; while in a reexposure after 12 months, it interfered with the current disease (43).

Different prospective cohort studies that explore the natural history of sequential infections by DENV support variable protective and pathogenic effects of cross-immunity between DENV serotypes. Study by Anderson and colls. showed that a short interval of 18 months between primary and secondary

DENV infection in a Thai child was associated with an increased likelihood of an asymptomatic infection; Dengue fever after an average interval of 21 months; and severe dengue (DHF) after an average interval of 30 months. The time between infections was not a significant predictive factor for the disease after tertiary and quaternary infections, suggesting that immunity after multiple sequential infections may confer long-term protective or sustained effects (44). These data were corroborated by researchers from Nicaragua (45). Thus, these observations suggest that heterotypic antibodies from a primary infection protect or mitigate the disease after secondary infection, but that protection decreases over time. In addition, heterotypic antibodies provide short-term cross-protection (3 to 12 months) (44), where evidence also indicates that these antibodies may be associated with severe dengue after longer intervals between primary and secondary (46). This is because it has been shown that the titer of heterotypic antibodies decreases over time and therefore would be related to the severity of subsequent infections (46–48).

For decades, the hypotheses of the original antigenic sin of T lymphocytes and the antibody-dependent enhancement (ADE) of infection have not explained, mutually or exclusively, why only part of the secondary infections resulted in severe dengue. The evaluation of these hypotheses is increasingly crucial now, not only in relation to the 4 serotypes of DENV but also by ZIKV. It is still controversial, but the evidence indicates that DENV and ZIKV induce cross-reactivity at the humoral and cellular levels.

One of the first studies that sought to understand the effect of the responses of preexisting T lymphocytes to DENV on the severity of secondary infection by the virus was carried out by Mangada and colls. This study was carried out with Thai school-age children, with secondary infection by DENV-3, some hospitalized and diagnosed with DHF. In general, the authors found reactive responses both to antigens of the homologous serotype and, also to antigens of the cross-reactivity serotype in relation to the proliferation and production of IFN- γ and TNF- α . They did not see significant differences between the hospitalized or non-hospitalized groups, but they did observe a tendency for cross-reactivity responses with TNF- γ production in non-hospitalized individuals (49).

In 2003, Mongkolsapaya and colleagues conducted a study that led to the demonstration of the phenomenon of the original antigenic sin of T lymphocytes. The authors studied the responses of CD8⁺ T lymphocytes in Asian children with the HLA-A*11 allele who were hospitalized with secondary infections and to assess specific and cross-reactivity responses for DENV serotypes, PBMCs were marked with pairs of tetramers for each of the serotypes. Particularly relevant, the authors demonstrated that in secondary DENV-1 infection, many T lymphocytes were marked by tetramers targeting DENV-3 and, in secondary DENV-2 infection, many T lymphocytes reacted better to DENV-1 and DENV-3 tetramers. A given DENV serotype can stimulate the proliferation of a spectrum of memory clones with different affinities and cross-reactivity. The discovery that secondary infection by a serotype that has similar but distinct epitopes could stimulate the proliferation of heterologous, low-affinity and cross-reactive clones, is consistent with the phenomenon of original antigenic sin (50).

Later, several authors sought to understand how the T-lymphocyte-mediated response was modulated in the context of original antigenic sin. For this, they examined the response of T lymphocytes to peptides of NS3 DENV protein, considered the most immunodominant for the cellular response in patients with primary and secondary infections with dengue fever (DF) and DHF. The authors found that in both primary and secondary DHF, less than 20% of T lymphocytes produced CD107a (a measure of degranulation capacity), while > 80% produced only cytokines. This situation is reversed in primary DF, where 71% produces only CD107a and 29% cytokine, and secondary DF, where 45% produces CD107a. CD107a expression was found in CD4⁺, in addition to CD8⁺ T lymphocytes, which fits the reports of anti-dengue CD4⁺ T lymphocyte cytotoxicity. For the first time, the authors proposed that the limited cytotoxic potential of T lymphocytes, in a subset of patients, may not be associated with early viral control, but related to low effectiveness. In addition, cytokine-producing T lymphocytes are stimulated, which in the context of the presence of the virus or viral antigens, will lead to the excessive production of pro-inflammatory cytokines, which may trigger tissue damage and the vascular leakage characteristic of DHF/DSS (51).

On the other hand, the idea that T-lymphocyte responses from cross-reactive memory appear only in secondary infections and that these cells contribute to the severity of dengue has been increasingly challenged. In this context, Friberg and collaborators evaluated CD8+ T lymphocytes specific for the NS₃₁₃₃ epitope of the DENV restricted to the HLA-A*11:01 allele in a cohort of patients with the HLA-A*11 allele presenting primary or secondary infection, in addition to mild or severe illness. The results showed expansion and activation of DENV-specific CD8+ T lymphocytes during acute infection, which are predominantly reactive to the infection serotype, regardless of the history of DENV infection. However, specific responses to the NS₃₁₃₃ epitope did not correlate with previous antigenic exposure or disease severity in this cohort. These data were analyzed according to the clinical diagnosis (DF versus DHF) or with continuous measures of disease severity, such as pleural effusion index, hemoconcentration or platelet quantification (52). Interestingly, Dung and collaborators demonstrated that nonspecifically activated CD8+ T lymphocytes and NS₃₁₃₃₋₁₄₂-specific CD8+ T lymphocytes are generally not measurable in peripheral blood before the start of hemoconcentration, thrombocytopenia or resolution of viremia and, therefore, appear unlikely to be critical triggers of these events (53).

From there, we describe in more detail the study developed by Weiskopf and colls. in which authors used healthy blood donors from Sri Lanka, hyperendemic parents of DENV. Detailed analysis of the CD8+ T lymphocytes demonstrated, notably, that the magnitude, frequency, and amplitude of the responses of the memory CD8+ T lymphocytes in these patients were dictated by the HLA alleles they carried. Thus, individuals with the HLA-B*35:01, B*07:02 and B*58:01 alleles, said to be protective, are those whose responses are more robust and wide, when compared to individuals with the susceptible HLA alleles, such as HLA-A*24:02 and A*01:01 (54). Consistent with these findings, Simon-Lorière and colls. performed an analysis of the serum and immunological genetic transcripts of Cambodian children infected with DENV-1, to understand what may be determining the differences in symptomatic and asymptomatic clinical infections. While the inflammatory pathways and the innate immune response pathways were similar between asymptomatic individuals and symptomatic patients, the expression of proteins related to the

presentation of antigens and subsequent T and B lymphocyte activation pathways was differentially regulated, regardless of viral load and previous history of DENV infection. Together, asymptomatic infection is associated with increased activation of adaptive immunity and adequate control mechanisms, leading to the elimination of viral infection without excessive immune activation (55).

Still, to understand the immune mechanisms involved in the severity of dengue, Tian and colls. observed a higher frequency of double-positive CD4+ T lymphocytes (DP) for IL-10+ IFN- γ + in DHF patients when compared to those with DF. The transcriptomic signatures of the transcriptomic profile of these DP cells were similar in the DF and DHF groups and partially overlapped those of the cytotoxic T CD4+ lymphocytes and type 1 (Tr1) regulators, although the majority were neither cytotoxic nor Tr1, and included IL-21, IL-22, CD109, and CCR1. Overall, this study revealed a subset of DENV-specific T DP lymphocytes in patients with acute disease and argues against altered T DP lymphocytes as a determinant for DHF (56).

With the new scenario of ZIKV outbreaks in the world, the authors wanted to understand whether the pre-existing immunity of T lymphocytes directed to the DENV epitopes modulates the responses mediated by T lymphocytes that respond to ZIKV. Grifoni and colls. published data that contributed greatly to this approach. The authors demonstrated that memory T-lymphocyte responses induced by a previous DENV infection or vaccination with attenuated dengue tetravalent vaccines (TDLAV) recognize ZIKV-derived peptides. However, the structural proteins E, prM and C of ZIKV are the main targets of CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses, unlike DENV T lymphocyte epitopes that are found mainly in non-structural regions. Also, in patients' immune to DENV and infected by ZIKV, T lymphocyte responses to ZIKV are detected earlier in the acute phase and to a greater extent but decrease in the convalescent phase. On the other hand, in no immune DENV and ZIKV infected patients, the frequency of response of T lymphocytes to ZIKV continues to increase in the convalescent phase, indicating a more efficient control of viral replication and/or elimination of ZIKV antigens. The quality of responses is also influenced by prior exposure to DENV. CD8+ ZIKV-specific T lymphocytes from patients' immune to DENV

and infected by ZIKV increased the expression of granzyme B and PD-1, unlike non-immune patients to DENV and infected by ZIKV (57).

Our group conducted a cross-sectional study in which we compared the activation of T lymphocytes in acute infection in DENV or ZIKV mono-infected individuals and co-infected by both viruses. An increase in the frequency of CCR5, CX3CR1 and CXCR3-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes was seen in infections by DENV and ZIKV and in co-infection by DENV/ZIKV, that is, independent of infection, in relation to healthy controls. However, DENV/ZIKV co-infection decreased the ability of CD4⁺ T lymphocytes to produce IFN- γ , TNF, TNF/IFN- γ and TNF/IL-2, compared to mono-infections by DENV or ZIKV. Thus, we emphasize the potential impact of coinfection on the immune response of human hosts, especially in areas where DENV and ZIKV co-circulate (58).

In addition, a study by Lim and colls. recruited individual's immune to DENV and DENV-naives, all without prior exposure to ZIKV, to carry out their studies. The authors demonstrated that individual's immune to DENV showed cross-reactivity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, mainly in relation to the NS3 epitopes of DENV and ZIKV. Regarding the effector functions of these cells, individuals with previous immunity to DENV exhibited memory CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes that can exert antiviral effector functions against cells infected by ZIKV *in vitro*, producing antiviral mediators (IFN- γ , TNF- α , IL-2 and granzyme B). Cross-reactive CD8⁺ T lymphocytes exhibit direct cytolytic capacity in cells infected by ZIKV. Thus, in humans, the pre-existing immunity of T lymphocytes in relation to DENV may provide an immunoprotective role in ZIKV infection (59).

In this same line, Delgado and collaborators identified several epitopes of T lymphocytes ZIKV-specific or shared between DENV and ZIKV in blood donors with a history of infection only by ZIKV or coinfection by DENV and ZIKV (60). The authors confirmed that the responses of DENV-specific T lymphocytes are predominantly directed against NS3, NS4B and NS5, but, differently from what was observed by Grifoni and colls., the response against ZIKV was directed mainly against epitopes of NS1, NS3 proteins and NS5. Considering that a higher percentage of sequence identity is observed between

the NS5 proteins of ZIKV and DENV, it led the authors to postulate that the NS5 region contains more peptides recognized by cross-reactive T lymphocytes, while the protein NS1 is preferentially directed to ZIKV specific T lymphocyte response (57).

Additionally, Herrera and colls. demonstrated that based on the responses of IFN- γ and TNF- α producing T lymphocytes from Brazilians, the NS3 protein protease region of DENV and ZIKV differentiates infections by DENV and ZIKV with a sensitivity of 94% and specificity of 92%, while individuals with primary and secondary infections by DENV have similar T-lymphocyte response patterns, with wide cross-reactivity to the ZIKV NS3 protein helicase. Finally, individuals with primary ZIKV infections and primary ZIKV/DENV co-infection have high cross-reactivity to the helicase region of the NS3 protein of DENV. Similar analyzes were performed to assess responses of human T lymphocytes from African patients. Specifically, the authors demonstrated that T lymphocyte responses to the NS3 protein protease are specific for ZIKV and DENV, but the responses directed to the NS3 helicase region are cross-reactive (61).

Immunological memory and vaccine design based on the T cell responses: two major challenges in the context of sequential infections and co-infections between related arboviruses

Compared to naive T lymphocytes with the same antigenic specificity, memory T lymphocytes persist in greater numbers, reside in peripheral organs, are ready to proliferate immediately, perform cytotoxic functions and secrete effector cytokines after antigen encounter, and there are still different subpopulations in different metabolic, transcriptional and epigenetic states. Despite some similarities between effector T lymphocytes and memory T lymphocytes at the molecular, epigenetic, metabolic and functional level, memory T lymphocytes persist in the long term, while effector T lymphocytes undergo a robust contraction. The characteristics of memory T lymphocytes to provide protection depend on the nature of the pathogen and, over the past 20 years, it has become clear that memory T lymphocytes consist of a

heterogeneous population, which differ in phenotype, function and protective capacity (reviewed by (62)).

The description of different subpopulations of memory T lymphocytes has been recurrent (reviewed by (63)). The first characterization of the heterogeneity of these cells in a set of CD8⁺ T lymphocytes of memory of undefined origin in humans described two subpopulations: the effector memory CD62L^{low} / CCR7^{low} (TEM) and the central memory CD62L^{high} / CCR7^{high} (TCM). The expression of CCR7 and CD62L in TCM lymphocytes facilitates their return to secondary lymphoid organs, while TEM lymphocytes are more cytolytic and express integrins and chemokine receptors necessary for localization in inflamed tissues (64). CD45RA expression is generally associated with naive T lymphocytes, but a subpopulation of TEM lymphocytes reexpress CD45RA, called TEMRA, which appears after antigenic stimulation and their molecular characteristics and functions have been described (65).

It is interesting to highlight a study by Weiskopf and colls. that demonstrated a high frequency of CD4⁺ TEMRA DENV-specific T lymphocytes in donors with the HLA-DRB1*04:01 allele associated with protection against severe dengue. CD4⁺ TEMRA T lymphocytes express several cytotoxic molecules, including CD107a, perforin, granzyme B, as well as the CX3CR1 receptor and actively participate in the cytolytic mechanism. Both CD4⁺ and CD8⁺ TEMRA lymphocytes have been increasingly involved in protective immunity against DENV (66). Study by Tian and colls. showed that the phenotype of CD4⁺ TEMRA T lymphocytes is heterogeneous among individuals, based on the expression of the G protein-coupled receptor, GPR56. T CD4⁺ GPR56⁺ TEMRA lymphocytes exhibit a transcriptional and proteomic program with distinct cytotoxic characteristics from TEM lymphocytes. In addition, GPR56⁺ TEMRA lymphocytes have higher levels of clonal expansion and most are specific to DENV (67). In the same way, Patil and colls., based on previous reports on the protective role of CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes (CD4-CTLs) in dengue, it was evaluated the transcriptional profile to reveal the heterogeneity of CD4-CTL and its clonality in humans. The analysis of differential gene expression revealed a spectrum of transcripts, several linked to cytotoxic and co-stimulatory function that are expressed at higher levels, in addition to a

marked clonal expansion in the CD4-CTL TEMRA, compared to the CD4+ TCM and TEM T lymphocytes (68).

In addition, a study by de Alwis and colls. demonstrated that the majority of CD8+ T lymphocytes producing IFN- γ + specific for DENV epitopes are TEM (CD45RA-CCR7-) or TEMRA (CD45RA+ CCR7-) lymphocytes (69). Recently, Tian and colls. analyzed the transcriptomic profiles of CD8+ TEM and TEMRA lymphocytes specific for DENV epitopes from healthy donors with secondary DENV infection. The authors demonstrated that more genes are expressed at higher levels in TEM lymphocytes than in TEMRA. On the other hand, TEMRA has greater expression of immunoglobulin-type receptors (KIRs), including KIR2DL3, suggesting a more specialized phenotype and function. Finally, both TEM and TEMRA specific CD8+ T lymphocytes exhibit preferential use of some CDR3 repertoires of the TCR β chain (TRB), indicating a clonal expansion of only a few T lymphocyte clones (56).

Regarding immune memory in ZIKV infection, a study by Ricciardi and colls. followed longitudinally the responses of B and T lymphocytes in an individual never exposed to DENV and infected by ZIKV during the 2016 outbreak in Miami. The authors used the 9-mer GLDFSDLYY tetramer of ZIKV restricted to HLA-A*01:01, to track the ZIKV-specific response among CD8+ T lymphocytes. The initial response to the tetramer appeared on the 7th day after infection, peaked on the 21st day and was still present, albeit at a very low level, on the 148th day. Phenotypic analysis revealed that most cells positive for the tetramer were characterized by TEM lymphocytes (70).

Another study developed by Cimini and colls. analyzed a larger cohort of Italian patients infected by ZIKV. The authors analyzed the differentiation profile of CD4+, CD8+ and CD3+CD4-CD8- or double-negative (DN) lymphocytes by the expression of CD45RA and CD27, allowing to discriminate naive T lymphocytes (CD45RA+CD27+), TCM (CD45RA-CD27+), TEM (CD45RA-CD27-) and TEMRA (CD45RA+CD27-) in patients with acute ZIKV or DENV infection. The analysis of CD8+ T lymphocytes showed no difference in the differentiation profile between ZIKV, DENV, and healthy individuals. In contrast, patients with ZIKV showed a lower frequency of CD4+ T lymphocytes and DN TCM, but an increase in CD4+ and DN TEM and TEMRA compared to

DENV and control patients. In addition, a substantial expansion of T DN lymphocytes that express TCR V δ 2 has been specifically observed in patients with ZIKV. These V δ 2 T lymphocytes that had a TEMRA profile, express granzyme B and were IFN- γ producers (71).

As described, DENV and ZIKV are among the most closely related pathogenic human flaviviruses, with 55.1% to 56.3% amino acid sequence identity. This close antigenic relationship to the levels of antibodies and T lymphocytes can be considered as a challenging factor for the development of vaccines for both viruses, due to possible roles in the protection and pathogenesis of antibodies and T lymphocytes of cross-reactivity. In addition, ZIKV's unusual transmission pathways also pose challenges for the development of drugs and vaccines (reviewed by (20)). The development of the DENV vaccine focused on tetravalent formulations that simultaneously provide immunity to all 4 serotypes (72). Currently, 5 types of dengue vaccines are under investigation, including live attenuated vaccine, inactivated vaccine, recombinant subunit vaccine, viral vector vaccine, and DNA vaccine (73). Among them, we will discuss three live attenuated vaccines whose T cell response has been evaluated in previous studies.

Live Attenuated Chimeric Yellow Fever – Dengue Vaccines- CYD-TDV vaccine or Dengvaxia® on T cell activation

CYD-TDV (Live Attenuated Chimeric Yellow Fever – Dengue Vaccines) or Dengvaxia® is a vaccine licensed by the Sanofi Pasteur company, a chimeric live attenuated vaccine based on the expression of the prM and E from 4 DENV serotypes in a skeleton of the yellow fever virus 17D (YF17D). Study by Guy and colls. evaluated the responses of CD4+ and CD8+ T lymphocytes specific for DENV1-4 and 17D-204 (YF17D) induced by the CYD-TDV vaccine (Dengvaxia®) in immune patients or flavivirus-naive. Studies have shown that CYD-TDV induced a strong YFV CD8+ NS3-specific T lymphocyte response in DENV-naive individuals, but a weak DENV CD8+ NS3-specific T lymphocyte response in individuals immune to DENV, indicating an absence of cross-reactivity (74). In addition, study by Harenberg and colls. showed that NS3 DENV3-specific

CD4+IFN γ +TNF α + responses were detected before CYD-TDV vaccination. Vaccination induced responses of NS3 YF-17D-specific CD8+IFN γ + T lymphocytes, without significant TNF α production, and a CYD-TDV-specific Th1/Tc1 cell response in all participants, characterized by predominant IFN γ secretion compared to TNF α and with low levels of IL-13. These findings confirmed previous observations about the nature and specificity of cellular responses induced by CYD-TDV and, for the first time, demonstrate the persistence of cellular responses after one year (75).

Live Attenuated DENV Vaccine - DLAV on T cell activation

The challenge for the development of a vaccine for DENV is that it needs to not only have immunogenicity for all 4 DENV serotypes, but also enough attenuation of each monovalent component. The live attenuated DENV vaccine was developed by the U.S. National Institutes of Health. The 3'-UTR region of the flavivirus genome was chosen as the target of mutagenesis, as it plays an important role in viral RNA replication. TV003 is a mixture of four candidates for an attenuated recombinant vaccine against dengue, including rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31 and rDEN4 Δ 30, which is undergoing clinical testing. More components of the attenuated DENV-2 have been added to TV005 (76).

Weiskopf and colls first characterized the responses of CD8+ T lymphocytes after vaccination with DLAV (66). As stated, TV005 is a mixture of four candidates for a recombinant vaccine for live attenuated DENV (DLAV) (rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31 and rDEN4 Δ 30) and has previously been shown to induce seroconversion to four DENV serotypes in 90% of recipients of DENV vaccine (77). The authors collected blood from participants in a study unit who received monovalent or tetravalent DLAV. After vaccination, responses from CD8+ T lymphocytes to a set of MHC class I restricted DENV peptides were easily detectable and comparable to natural infection. Interestingly, the responses of CD8+ T lymphocytes to structural and non-structural proteins were observed after monovalent DLAV, while after tetravalent DLAV they were dramatically focused on highly conserved non-structural

proteins, capable of eliciting multifunctional T lymphocyte responses. Later, the same group evaluated the responses of CD4⁺ T lymphocytes from donors vaccinated with tetravalent DLAV with stimulation of PBMCs with a set of DENV peptides restricted to MHC class II. The responses of CD4⁺ DENV-specific T lymphocytes were concentrated predominantly on antigens of proteins C, NS3 and NS5. Like CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocyte responses in vaccinated individuals were similar in magnitude and amplitude to those after natural infection, recognized the same antigen hierarchy and had similar HLA restriction profiles (78). TV003/TV005 is very different from CYD-TDV in characteristics due to its different structures of viral particles, infectivity, and immunogenicity. For example, CYD results in a higher risk of viremia, less resistance to the DENV-2 virus and a lower level of induced immune balance than TV003/TV005 (77).

Recombinant RNAs of an attenuated DENV-2 (TDV-2) strain, DENVax vaccine on T cell activation

The recombinant RNAs of an attenuated DENV-2 (TDV-2) strain and three chimeric viruses containing the DENV prM and E genes, expressed in the context of the TDV-2 (TDV-1, TDV- 3, TDV-4, respectively) (79–83) were used to transfect Vero cells to produce a candidate vaccine called DENVax (84). Study by Chu and colls. characterized the response of CD8⁺ T lymphocytes in human volunteers who have never had contact with a flavivirus, vaccinated with two doses of DENVax 90 days apart subcutaneously or intradermally. The responses of CD8⁺ T lymphocytes were higher on the 90th day after the 1st dose and were still detectable on the 180th day after the 2nd dose. In addition, CD8⁺ T lymphocytes were multifunctional, producing two or more cytokines simultaneously and reactive to NS proteins from the other 3 DENV serotypes (85).

Conclusion

Sequential infections and concomitant co-infections by different arboviruses in humans have been described in different countries, including

Brazil. Unlike sequential infections, studies on coinfection with different arboviruses are still scarce. Our group simultaneously detected DENV and ZIKV RNAs in samples from acute patients. In coinfections, the Ct values of DENV and ZIKV tend to be lower compared to the Ct of mono-infections. So far, it has been reported that coinfecting patients have a very similar clinical course compared to mono-infected ones. Immunological analysis from coinfecting patients demonstrated an increase in the frequency of chemokine receptors-expressing T-lymphocytes, very similar to mono-infected ones. However, in co-infection there is a decrease in multifunctional CD4⁺ T lymphocytes compared to mono-infections. Many studies have evaluated sequential infection by different DENV serotypes, and an increasing number of studies have been addressing sequential infection by DENV followed by ZIKV. In sequential infections, understanding the mechanisms of T cell original antigenic sin is crucial, not only due to the 4 serotypes of DENV, but also to ZIKV. The phenomenon of original antigenic sin was originally described in dengue when, in a secondary infection by a heterologous serotype. Subsequently, the authors realized a more detailed analysis of cross-reactive T lymphocytes showing that the magnitude, frequency, and amplitude of T lymphocyte responses from patients with secondary infection were dictated by the HLA alleles they carried. With the recent ZIKV outbreaks, it has been shown that T lymphocytes from DENV-infected patients or immunized with attenuated tetravalent dengue vaccines (TDLAV) recognize peptides derived from ZIKV, indicating cross-reactivity between DENV and ZIKV. Interestingly, it was demonstrated that the structural proteins of ZIKV are the main targets of T lymphocyte responses, unlike DENV T lymphocyte epitopes, found mainly in non-structural regions. Thus, in humans, the pre-existing immunity of T lymphocytes in relation to DENV may provide an immunoprotective role in ZIKV infection. For ZIKV infection, it is not yet clear which subpopulation of memory T lymphocytes is more prevalent, while a high frequency of DENV-specific T TEMRA lymphocytes is observed in DENV-donors with alleles associated with protection (Figure 1). In summary, a live vaccine attenuated by CYD-TDV has definitive protection in DENV-immune individuals for over 9 years of age. The rDENV Δ 30 vaccine indicates a more balanced protective immune response among the 4 DENV serotypes compared to CYD-TDV, while DENVax is highly

immunological (Figure 2). Two main points need to be investigated: first, to understand the clinical, virological and immunological aspects of co-infections and their impact on the population's health. Secondly, what are the most real aspects of sequential ZIKV and DENV infection, looking mainly at the susceptibility and/or resistance to developing severe forms of Zika.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

Jessica Badolato Corrêa da Silva, Débora Familiar-Macedo and Iury Amancio Paiva are recipient of Doctoral fellowship from Brazilian research institutions IOC/Fiocruz, CAPES and, CNPq.

References

1. Vogels CBF, Rückert C, Cavany SM, Perkins TA, Ebel GD, Grubaugh ND. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS Biol.* 2019;17(1):1–16.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–7.
3. Perkins TA, S. Siraj A, Ruktanonchai CW, Kraemer MUG, Tatem AJ. Model-based projections of Zika virus infections in childbearing women in the Americas. *Nat Microbiol.* 2016;1(9).
4. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* 2015;372(13):1231–9.
5. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med.* 2016;374(7):601–4.
6. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects - Reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016;374(20):1981–7.
7. Gardner LM, Bota A, Gangavarapu K, Kraemer MUG, Grubaugh ND. Inferring the risk factors behind the geographical spread and transmission of Zika in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(1):1–25.
8. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected female-to-male sexual transmission of zika virus — New York city, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(28):716–7.
9. Motta IJ, Spencer BR, Silva SGC da, Arruda MB, Dobbin JA, Gonzaga YBM, et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *N Engl J Med.* 2016;375(11):1100.

10. Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gómez WE, Franco-Paredes C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis.* 2016;14(3):177–9.
11. GUBLER DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480–96.
12. Pan American Health Organization. Reported increase of congenital microcephaly and other central nervous system symptoms - 10 February 2016. 2016;
13. Brasil P, Jr. JPP, Moreira ME, Nogueira RMR, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016;375(35):2321–2334.
14. van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, James Barkovich A, van der Linden H, Rolim Filho EL, et al. Description of 13 infants born during October 2015–January 2016 with congenital zika virus infection without microcephaly at birth — Brazil. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(47):1343–8.
15. Van Der Linden V, Filho ELR, Lins OG, Van Der Linden A, Aragão MDFVV, Brainer-Lima AM, et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: Retrospective case series study. *BMJ.* 2016;354.
16. Ventura C V., Maia M, Dias N, Ventura LO, Belfort R. Zika: Neurological and ocular findings in infant without microcephaly. *Lancet [Internet].* 2016;387(10037):2502. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30776-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30776-0)
17. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89(17):8880–96.
18. Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, Grifoni A, Diamond MS, Sette A, et al. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLoS Curr.* 2016;
19. Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith ARY, Goo L, et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell Rep [Internet].* 2016;16(6):1485–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.049>
20. Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:279–308.
21. Carrillo-Hernández MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gómez-Rangel SY, Martínez-Gutiérrez M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):1–12.
22. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon J-P, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):381.
23. Iovine NM, Lednicky J, Cherabuddi K, Crooke H, White SK, Loeb JC, et al. Coinfection with zika and dengue-2 viruses in a traveler returning from Haiti, 2016: clinical presentation and genetic analysis. *Clin Infect Dis.* 2017;64(1):72–5.
24. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis.* 2016;63(12):1584–90.
25. Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS Curr.* 2018;
26. Estofolete CF, Terzian ACB, Colombo TE, de Freitas Guimarães G, Ferraz HC, da Silva RA, et al. Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during DENV

- outbreak in Brazil. *J Infect Public Health* [Internet]. 2019;12(2):178–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.09.007>
27. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48–53.
 28. Priyamvada L, Hudson W, Ahmed R, Wrammert J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: Implications for protection and pathology. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6(5):1–6.
 29. Sabin AB. RESEARCH ON DENGUE DURING WORLD WAR 11. *Am J Trop Med Hyg*. 1952;1:30–50.
 30. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644–52.
 31. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *J Infect Dis*. 2000;181(1):2–9.
 32. Garcia M, Wehbe M, Lévêque N, Bodet C. Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur Cytokine Netw*. 2017;28(2):41–51.
 33. Nasirudeen AMA, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1).
 34. Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Delineates Key Elements of TLR7 Signaling beyond Endosomal Recognition. *J Immunol*. 2006;177(10):7114–21.
 35. Morrison J, García-Sastre A. STAT2 signaling and dengue virus infection. *Jak-Stat*. 2014;3(1):e27715.
 36. Lai J, Wang M, Huang C, Wu C, Hung L, Yang C, et al. Infection with the dengue RNA virus activates TLR9 signaling in human dendritic cells. *EMBO Rep*. 2018;19(8):1–17.
 37. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons. *J Virol*. 2000;74(11):4957–66.
 38. Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0168-0>
 39. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus Infection: Enhancement by Gamma Interferon and Implications for Disease Pathogenesis. *J Virol*. 2001;75(8):3501–8.
 40. Ho L-J, Wang J-J, Shiao M-F, Kao C-L, Chang D-M, Han S-W, et al. Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Causes Cell Maturation and Cytokine Production. *J Immunol*. 2001;166(3):1499–506.
 41. Wakil AE, Wang ZE, Ryan JC, Fowell DJ, Locksley RM. Interferon γ derived from CD4+ T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *J Exp Med*. 1998;188(9):1651–6.
 42. Montoya M, Schiavoni G, Mattel F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*. 2002;99(9):3263–71.
 43. Sabin AB. Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1955;4(2):198–207.
 44. Anderson KB, Gibbons R V., Cummings DAT, Nisalak A, Green S, Libraty DH, et al. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with

- protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis.* 2014;209(3):360–8.
45. Montoya M, Gresh L, Mercado JC, Williams KL, Vargas MJ, Gutierrez G, et al. Symptomatic Versus Inapparent Outcome in Repeat Dengue Virus Infections Is Influenced by the Time Interval between Infections and Study Year. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):1–10.
 46. Guzmán MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazquez S, et al. Epidemiologic Studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol.* 2000;152(9):793–9.
 47. Gubler DJ. Dengue in the United States, 1982. *Morb Mortal Wkly Rep - Centers Dis Control.* 1984;33(1):3–5.
 48. Guzmán MG, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: Death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2002;11(4):223–7.
 49. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-Specific T Cell Responses in Peripheral Blood Mononuclear Cells Obtained prior to Secondary Dengue Virus Infections in Thai Schoolchildren. *J Infect Dis.* 2002;185(12):1697–703.
 50. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9(7):921–7.
 51. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(39):16922–7.
 52. Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, Potts JA, Greenough T, Kalayanarooj S, et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Sci Rep.* 2011;1:1–9.
 53. Dung NTP, Le Duyen HT, Van Thuy NT, Van Ngoc T, Van Vinh Chau N, Hien TT, et al. Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. *J Immunol.* 2010;184(12):7281–7.
 54. Weiskopf D, Angelo MA, De Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22).
 55. Simon-Loriere E, Faye O, Prot M, Casademont I, Fall G, Fernandez-Garcia MD, et al. Autochthonous Japanese encephalitis with yellow fever coinfection in Africa. *Vol. 376, New England Journal of Medicine.* 2017. p. 1483–5.
 56. Tian Y, Grifoni A, Sette A, Weiskopf D. Human T Cell Response to Dengue Virus Infection. *Front Immunol.* 2019;10(September):1–9.
 57. Grifoni A, Pham J, Sidney J, O'Rourke PH, Paul S, Peters B, et al. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *J Virol.* 2017;91(24):1–19.
 58. Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Alves de Souza TM, Santos Barbosa L, Conrado Guerra Nunes P, da Rocha Queiroz Lima M, et al. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. *Immun Inflamm Dis.* 2018;6(2):194–206.
 59. Lim MQ, Kumaran EAP, Tan HC, Lye DC, Leo YS, Ooi EE, et al. Cross-reactivity and anti-viral function of dengue capsid and NS3- specific memory t cells toward Zika Virus. *Front Immunol.* 2018;9.
 60. Delgado FG, Torres KI, Castellanos JE, Romero-Sánchez C, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, et al. Improved immune responses against zika virus after sequential dengue and zika virus infection in humans. *Viruses.* 2018;10(9).

61. Herrera BB, Tsai WY, Brites C, Luz E, Pedrosa C, Drexler JF, et al. T Cell Responses to Nonstructural Protein 3 Distinguish Infections by Dengue and Zika Viruses. *MBio*. 2018;9(4):1–15.
62. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9(November):2692. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02692/full>
63. Caccamo N, Joosten SA, Ottenhoff THM, Dieli F. Atypical Human Effector/Memory CD4+ T Cells With a Naive-Like Phenotype. *Front Immunol*. 2018;9:2832.
64. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4 + T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2016;34(1):317–34.
65. Iyer V, Bhavsar K, Abraham S, Sharma A, Kohli V, Singh V. Dengue in India : Recent Advances , Prognostic Concerns and Future Considerations - A Review. *J Heal Syst*. 2018;III(2):3–8.
66. Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, Kolla R V., Silva AD De, Silva AM de, et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1 + cytotoxic CD4 + T cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015;112(31):E4256–63. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1505956112>
67. Tian Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, et al. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01728-5>
68. Patil VS, Madrigal A, Schmiedel BJ, Clarke J, O'Rourke P, Silva AD de, et al. Precursors of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes identified by single-cell transcriptome analysis. *Sci Immunol*. 2018;3(19).
69. de Alwis R, Bangs DJ, Angelo MA, Cerpas C, Fernando A, Sidney J, et al. Immunodominant Dengue Virus-Specific CD8 + T Cell Responses Are Associated with a Memory PD-1 + Phenotype. *J Virol*. 2016;90(9):4771–9.
70. Ricciardi MJ, Magnani DM, Grifoni A, Kwon YC, Gutman MJ, Grubaugh ND, et al. Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):1–23.
71. Cimini E, Castilletti C, Sacchi A, Casetti R, Bordoni V, Romanelli A, et al. Human Zika infection induces a reduction of IFN- γ producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V δ 2 T-cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06536-x>
72. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):518–28.
73. Deng SQ, Yang X, Wei Y, Chen JT, Wang XJ, Peng HJ. A review on dengue vaccine development. *Vaccines*. 2020;8(1):1–13.
74. Guy B, Nougarede N, Begue S, Sanchez V, Souag N, Carre M, et al. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*. 2008;26(45):5712–21.
75. Harenberg A, Begue S, Mamessier A, Gimenez-Fourage S, Seah CC, Liang AW, et al. Persistence of Th1/Tc1 responses one year after tetravalent dengue vaccination in adults and adolescents in Singapore. *Hum Vaccines Immunother*. 2013;9(11):2317–25.
76. Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, et al. Robust and balanced immune responses to all 4 dengue virus serotypes following administration of a single dose of a live attenuated tetravalent dengue vaccine to healthy, flavivirus-naïve adults. *J Infect Dis*. 2015;212(5):702–10.
77. Whitehead SS. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live

- attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYDTM vaccine? *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(4):509–517.
78. Angelo MA, Grifoni A, O'Rourke PH, Sidney J, Paul S, Peters B, et al. Human CD4 + T Cell Responses to an Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Parallel Those Induced by Natural Infection in Magnitude, HLA Restriction, and Antigen Specificity. *J Virol*. 2017;91(5):1–12.
 79. Kinney RM, Butrapet S, Chang G-JJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapavati N, et al. Construction of Infectious cDNA Clones for Dengue 2 Virus: Strain 16681 and Its Attenuated Vaccine Derivative, Strain PDK-53. *Virology*. 1997;230:300–8.
 80. Butrapet S, Huang CY-H, Pierro DJ, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Attenuation Markers of a Candidate Dengue Type 2 Vaccine Virus, Strain 16681 (PDK-53), Are Defined by Mutations in the 5' Noncoding Region and Nonstructural Proteins 1 and 3. *J Virol*. 2000;74(7):3011–9.
 81. Huang CY-H, Butrapet S, Pierro DJ, Chang G-JJ, Hunt AR, Bhamarapavati N, et al. Chimeric Dengue Type 2 (Vaccine Strain PDK-53)/Dengue Type 1 Virus as a Potential Candidate Dengue Type 1 Virus Vaccine. *J Virol*. 2000;74(7):3020–8.
 82. Huang CY-H, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 Virus as a Chimeric Carrier for Tetravalent Dengue Vaccine Development. *J Virol*. 2003;77(21):11436–47.
 83. Osorio JE, Huang CYH, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: A chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*. 2011;29(42):7251–60.
 84. Brewoo JN, Kinney RM, Powell TD, Arguello JJ, Silengo SJ, Partidos CD, et al. Immunogenicity and efficacy of chimeric dengue vaccine (DENVax) formulations in interferon-deficient AG129 mice. *Vaccine*. 2012;30(8):1513–1520.
 85. Chu H, George SL, Stinchcomb DT, Osorio JE, Partidos CD. CD8+ T-cell responses in flavivirus-naive individuals following immunization with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate. *J Infect Dis*. 2015;212(10):1618–28.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

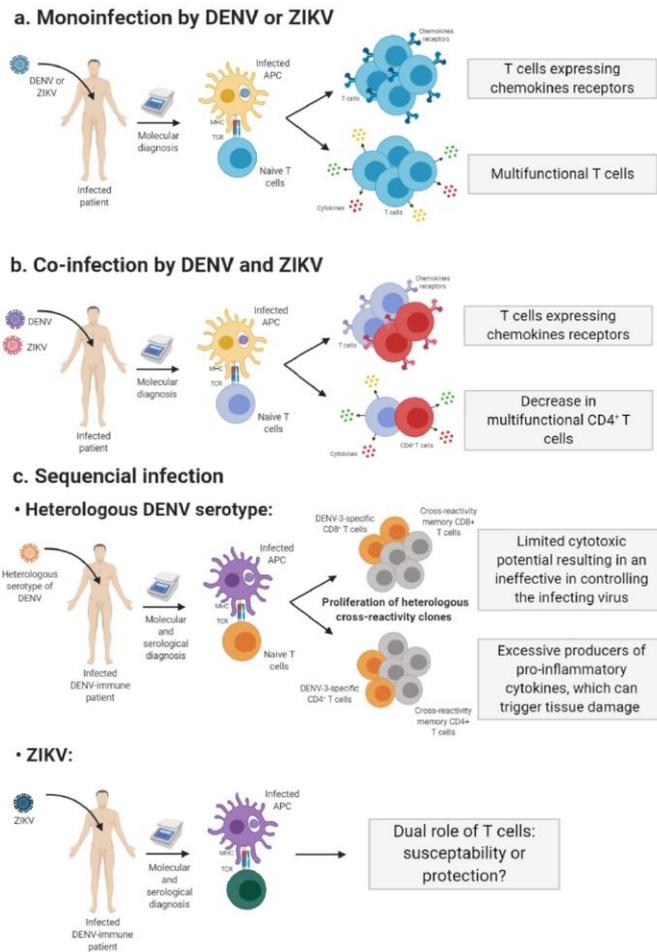


Figure 1. Simplified scheme of the two roles of T cells in the contexts of co-infection by DENV/ZIKV and in sequential infection by DENV and/or ZIKV. (a) Mono-infection caused by DENV or ZIKV leads to increased expression of chemokine receptors on T cells and an increased ability of these cells to produce a variety of cytokines. (b) In DENV/ZIKV co-infection, T cells also increase the expression of chemokine receptors, but are less cytokine-producing. (c) In sequential infections by different DENV serotypes, the phenomenon of original antigenic sin is observed. Cross-memory T cells are less cytotoxic and highly inflammatory, resulting in less viral control and an intense inflammatory process with tissue damage. On the other hand, in sequential infections by DENV, followed by ZIKV, T cells specific to DENV may cross-react with ZIKV. Further studies are needed to understand whether this cross-response between arboviruses is more protective or more pathogenic for humans.

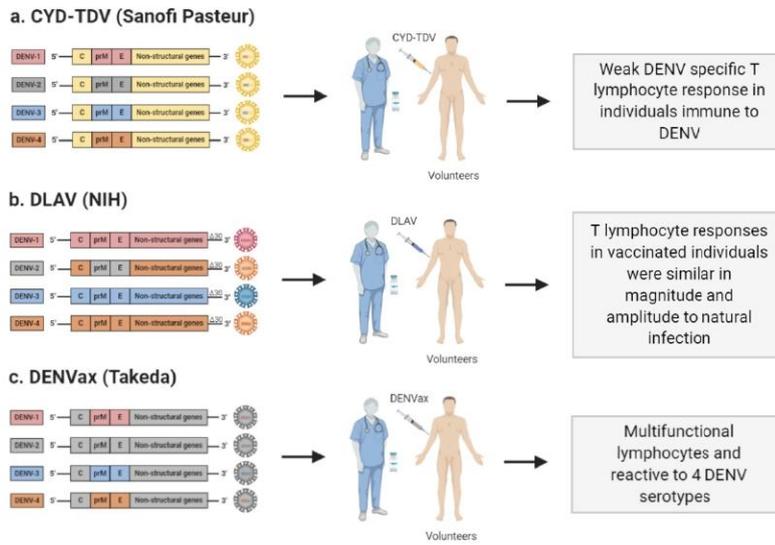


Figure 2: Simplified summary of three live attenuated vaccines against DENV in activating the T cell response. a) CYD-TDV (Live Attenuated Chimeric Yellow Fever – Dengue Vaccines) or Dengvaxia® is a chimeric live attenuated vaccine based on the expression of the prM and E from 4 DENV serotypes in a skeleton of the yellow fever virus 17D (YF17D). Studies have shown that CYD-TDV induced a weak DENV specific T lymphocyte response in individuals immune to DENV, indicating an absence of cross-reactivity. b) DLAV is a mixture of four candidates for an attenuated recombinant vaccine against dengue. CD8+ and CD4+ T lymphocyte responses in vaccinated individuals were similar in magnitude and amplitude to those after natural infection, recognized the same antigen hierarchy and had similar HLA restriction profiles. c) DENVax consists in the recombinant RNAs of an attenuated DENV-2 (TDV-2) strain and three chimeric viruses containing the DENV, prM and E genes, expressed in the context of the TDV-2 (TDV-1, TDV- 3, TDV-4, respectively). The responses of CD8+ T lymphocytes were still detectable for months. In addition, CD8+ T lymphocytes were multifunctional, producing two or more cytokines simultaneously and reactive to the other 3 DENV serotypes

6 DISCUSSÃO

Em 26/04/2016, a Agência Brasil divulgou dados sobre a tríplice epidemia causada pelos arbovírus: “com 91 mil casos de Zika, 802 mil de dengue e 39 mil de chikungunya, o Brasil vive desde 2015 uma epidemia das três doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*” (<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-04/brasil-vive-triplice-epidemia-de-virus-transmitidos-pelo-aedes-aegypti>). Neste mesmo período, a equipe do Laboratório de Imunologia Viral (LIV) reativou uma colaboração antiga com a equipe da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) e o grupo iniciou um trabalho de campo em busca de casos suspeitos pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS). Em 2016, na semana epidemiológica 52 do referido estado, foram registrados 44.814 casos e 642 óbitos de dengue e 1.640 casos de zika, sem óbitos. Nosso grupo coletou 134 casos suspeitos de arbovirose. Foram utilizados métodos moleculares e sorológicos para realização do diagnóstico diferencial das infecções pelos arbovírus circulantes, incluindo RT-PCR para DENV, ZIKV e CHIKV, ELISA de captura de NS1 do DENV, IgM anti-DENV e IgM anti-CHIKV. Este estudo foi publicado pela nossa equipe ([Azeredo et al., 2018](#)), no qual descrevemos os achados clínicos e laboratoriais desta coorte. Dos 134 casos suspeitos, 22,3% (30/134) eram reagentes para IgM anti-DENV e a detecção de NS1 do DENV foi vista em 37,3% (50/134) dos casos. Apenas 5,2% (7/134) dos pacientes foram reagentes para IgM anti-CHIKV. Com o uso dos métodos moleculares, detectamos 38% (51/134) dos pacientes infectados unicamente pelo DENV, 13,4% (18/134) pelo ZIKV e 13,4% (18/134) coinfectados pelo DENV e ZIKV (DENV/ZIKV). Nenhuma das amostras foram positivas para CHIKV pelo RT-PCR. O sorotipo DENV-1 foi o mais prevalente, tanto nos monoinfectados por DENV (88,2%, 45/51), como nos coinfectados DENV/ZIKV (94,4%, 17/18), seguido pelo DENV-4 presente em 11,7% (6/51) dos monoinfectados e 5,5% (1/18) dos coinfectados ([Azeredo et al., 2018](#)).

Outros estudos também têm relatado detecção de coinfeções em locais onde há cocirculação de mais de um arbovírus. [Estofolete e colaboradores \(2019\)](#) reportaram 12 casos de coinfeção por DENV/ZIKV em 1254 casos suspeitos oriundos de São José do Rio Preto, interior de São Paulo em 2016,

por métodos moleculares. [Mercado-Reyes e colaboradores \(2019\)](#) reportaram 34 casos de coinfeção das 23.871 amostras de casos suspeitos de arboviroses na Colômbia de 2015 a 2016. Dos 34 casos, 28 (82,3%) eram coinfectados por CHIKV/ZIKV, 3 (8,8%) por DENV/CHIKV e 3 (8,8%) por DENV/ZIKV. Por fim, [Carrillo-Hernandez e colaboradores \(2018\)](#) reportaram 30 casos de coinfeções em 157 amostras de casos suspeitos de arboviroses na divisa entre Colômbia e Venezuela de 2015 a 2016, dos quais a coinfeção por DENV/CHIKV estava presente em 12 casos (8,8%), DENV/ZIKV em 10 casos (7,3%) e CHIKV/ZIKV em 8 casos (5,8%). Sendo assim, existe uma maior probabilidade de detecção de coinfeções em regiões onde há cocirculação de mais de um arbovírus. Ressaltamos que os boletins epidemiológicos não relatam casos de coinfeção, sendo estas possivelmente mais comuns do que as descritas pela literatura.

Como esperado, nos questionamos se pacientes coinfectados por DENV/ZIKV apresentavam sintomas/sinais clínicos mais graves comparado aos monoinfectados. Essa análise foi realizada com base nos dados dos 134 casos suspeitos, no qual observamos que tanto pacientes monoinfectados como os coinfectados apresentaram sinais e sintomas clínicos bastante semelhantes e brandos ([Azeredo et al., 2018](#)). Nossos dados foram confirmados pelos estudos de [Mercado-Reyes e colaboradores \(2019\)](#) e [Estofolete e colaboradores \(2019\)](#). O primeiro descreveu que entre os casos de coinfeção, 2 DENV/CHIKV e 5 CHIKV/ZIKV foram fatais. A maioria destes apresentava alguma comorbidade, 3 desenvolveram alterações neurológicas e 2 sepse e falência múltipla de órgãos ([Mercado-Reyes et al., 2019](#)). O segundo estudo descreveu que no grupo DENV/ZIKV, 2 pacientes foram classificados como dengue com sinais de alarme, mas nenhum deles foi hospitalizado ou foi à óbito. Portanto, até o momento, não há descrições de que as coinfeções por DENV e ZIKV desencadeiam sintomatologias graves comparados às monoinfeções.

Considerando o aspecto multifatorial das arboviroses, a virulência do sorotipo viral é um dos fatores relacionado à gravidade da dengue. DENV-1 foi o sorotipo mais prevalente em nossa coorte. Estudo realizado por [Yung e colaboradores \(2015\)](#) em uma coorte de pacientes adultos de Cingapura nos anos de 2005 a 2011, observou que pacientes infectados pelo DENV-1 apresentaram um maior risco de desenvolver dengue grave quando comparados

aos pacientes infectados pelos DENV-2 ou DENV-3. Por outro lado, [Fried e colaboradores \(2010\)](#) avaliaram crianças tailandesas infectadas no período de 1996 a 2006 e observaram que infecções causadas pelo DENV-2, mas não pelo DENV-1, eram mais frequentes em pacientes com FHD grau I.

Além do fator viral, por décadas, diversos estudos tem demonstrado o envolvimento da resposta imune do hospedeiro na imunopatogênese da dengue, principalmente nos casos de infecção secundária por sorotipos heterólogos, baseado em duas teorias, a do “Pecado Antigênico Original” e a da “Facilitação da Infecção dependente de Anticorpos”. Com o tempo, foi ficando cada vez mais evidente que ambas as teorias não explicavam mutuamente ou exclusivamente, porque apenas uma parte das infecções secundárias resultava em dengue grave. Agora, como fica a resposta imune do hospedeiro nas coinfeções por diferentes arbovírus? Em mãos da coorte dos pacientes agudos oriundos de MS, fomos avaliar o *status* de ativação dos linfócitos T de pacientes agudos mono infectados por DENV ou ZIKV e dos coinfectados por DENV e ZIKV. Ressaltamos que esse estudo é o primeiro e único até o momento, a descrever a ativação da resposta imunológica no contexto das mono- e coinfeções pelos arbovírus DENV e ZIKV em humanos.

Baseado nos dados de RT-PCR ou de detecção da NS1 DENV, selecionamos 6 pacientes mono infectados por DENV, 4 mono infectados por ZIKV, 7 coinfectados por DENV e ZIKV e 4 controles saudáveis com histórico de infecção por DENV. Temos ciência do número pequeno de pacientes por grupo, por conta de algumas dificuldades. Primeiro, obtivemos um número reduzido de amostras de PBMC com viabilidade acima de 80-90%. Segundo, a titulação dos anticorpos monoclonais utilizados neste estudo indicava que a maioria deles precisava ser utilizado muito concentrado o que, na época, não tínhamos volume suficiente de reagente para garantir a avaliação de muitas amostras. Por último, essas amostras não foram avaliadas exclusivamente em nosso estudo, fez parte também da avaliação de outras linhas de pesquisa do LIV.

Nas PBMCs dos pacientes, avaliamos inicialmente a frequência de células T CD4 e CD8 que expressavam receptores de quimiocinas. O receptor CXCR3 foi um dos primeiros estudados na dengue. Os autores utilizaram camundongos

geneticamente deficientes de CXCR3 (CXCR3^{-/-}) e os compararam aos animais selvagens (wt, wild-type). Após infecção pelo DENV via intracerebral, os animais CXCR3^{-/-} apresentaram altas taxas de mortalidade e morbidade, comparados aos animais wt. Interessante, no cérebro dos animais CXCR3^{-/-} foi encontrada alta carga viral e poucos linfócitos T CD8⁺ quando comparados aos wt, o que levou os autores a sugerir que CXCR3 participava do recrutamento de linfócitos T CD8 para sítios de infecção pelo DENV e que, na ausência dele, a eliminação do vírus era prejudicada (Hseih et al., 2006).

Nosso grupo já tinha observado uma alta frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CCR5, linfócitos T CD4⁺ expressando CXCR3 e linfócitos T CD8⁺ expressando CCR4⁺ no sangue de pacientes infectados pelo DENV em estudo anterior. Associado a expressão dos receptores de quimiocinas, nós demonstramos que esses linfócitos também expressavam marcadores funcionais de ativação e citotoxicidade (CD44, CD29, CD127^{low} e CD107a). Neste mesmo estudo, demonstramos um aumento na frequência de células CCL5⁺ no tecido hepático de casos fatais por dengue. A partir do conjunto de dados, sugerimos que linfócitos T funcionais que coexpressam receptores de quimiocinas, poderiam migrar facilmente do sangue para os tecidos, na tentativa de controlar o vírus tecidual (de-Oliveira-Pinto et al., 2012). Neste mesmo contexto, Rivino e colaboradores (2015) observaram que PBMCs de pacientes infectados pelo DENV após estimulação *in vitro* com peptídeos NS3 do DENV, apresentavam um aumento da expressão CCR5, CXCR3 e CXCR6 e o marcador de *homing* da pele antígeno associado a linfócitos cutâneos (*skin-homing marker cutaneous lymphocyte-associated antigen*). Esse dado foi correlacionado à capacidade *in vivo* dos linfócitos T trafegarem para a pele durante a infecção por dengue.

Assim, linfócitos T funcionais expressam receptores de quimiocinas na infecção pelo DENV. Isso foi bem demonstrado no estudo de Weiskopf e colaboradores (2015) que viram que linfócitos T CD4⁺ que expressavam CX3CR1 específicos aos epítomos de DENV eram altamente polarizadas para um fenótipo citotóxico. Interessante ressaltar que essas células se correlacionaram com o alelo protetor HLA-DR*04:01, observado com mais frequência em pacientes que desenvolveram a forma branda da dengue. Os

autores discutiram o desempenho dessas células no controle da infecção viral *in vivo*.

Estudos também descrevem que fatores genéticos do hospedeiro tem um papel importante na gravidade da doença. As respostas imunes de linfócitos T antígeno-específicos são impulsionadas por dois fatores específicos do hospedeiro. Primeiro, a capacidade de moléculas de MHC classe I e II de se ligarem e apresentarem determinados dos peptídeos derivados de antígenos. Segundo, a capacidade dos linfócitos T de reconhecerem, através do receptor de linfócitos T (TCR), o complexo peptídeo-MHC. Sendo assim, além da teoria da pecado antigênico original, diferentes estudos têm destacado o envolvimento dos genes de HLA classe I e II com diferentes manifestações clínicas na infecção pelo DENV. O MHC é um componente central na resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento das formas graves da doença e estudos demonstram que algumas variantes das moléculas de HLA classe I e II estariam associadas com essas condições em diferentes populações (Loke, et al., 2001; Stephens, et al., 2002; Sierra, et al., 2007; Nguyen, et al., 2008; Falcon-Lezama, et al., 2009; Appana, et al., 2010; Malavige et al., 2011). Os genes de HLA humanos são extremamente polimórficos, apresentando mais de 26 mil alelos descritos (Sette & Sidney, 1999; Greenbaum, et al., 2011; <http://hla.alleles.org/> - Março de 2020). Além disso, cabe ressaltar que a frequência gênica desses alelos é altamente variável entre as diferentes populações mundiais. Portanto, a associação entre susceptibilidade/resistência às formas graves com determinados alelos de HLA de uma determinada população, pode não ser confirmada em outras (Sette & Sidney, 1999).

O papel dos linfócitos T no controle da dengue tem sido demonstrado por vários grupos que correlacionam a resposta efetora celular T com a expressão de certas moléculas de HLA (Malavige et al., 2011; Stephens et al., 2002; Loke et al., 2001; Appanna et al., 2010). Estudo realizado por Weiskopf e colaboradores (2013) confirmaram que os epítomos das proteínas NS3, NS4B e NS5, mas não NS1 e E, eram as mais frequentemente reconhecidas e induziam de uma resposta robusta mediada por linfócitos T CD8⁺ em um grupo de doadores sadios imunes ao DENV oriundos do Sri Lanka. Uma maior variação na frequência e magnitude da resposta dos linfócitos T foi observada em função

da presença de certos alelos de HLA, nos quais alguns alelos foram associados à baixa frequência e magnitude de resposta de linfócitos T (como, A*01:01, A*24:02) enquanto outros, à alta frequência e magnitude de resposta (como, B*07:02, B*35:01). Ainda, outros alelos foram associados à baixa frequência e alta magnitude (B*40:01) ou à alta frequência e baixa magnitude (A*26:01). Análise das citocinas produzidas pelos linfócitos T DENV-específicos revelou que respostas de alta magnitude estavam associadas às respostas multifuncionais pelos linfócitos T ([Weiskopf et al., 2013](#)).

A magnitude da funcionalidade da resposta dos linfócitos T deve ser visto por alguns parâmetros funcionais, destacamos: (i) habilidade de proliferar ou induzir a proliferação de outras células-imunes, através da secreção de fatores de crescimento; (ii) compartimentalização da resposta imunológica onde ela se faz necessária, através da secreção de quimioatraentes; e (iii) ação efetora, seja através da indução de morte de células infectadas por mecanismos citolíticos ou pela secreção de citocinas ([Seder et al., 2008](#)).

Em estudo de resposta à vacinação utilizando vacina atenuada de DENV-1 (rDEN1Δ30), indivíduos voluntários foram infectados com baixa dose de DENV-1 e em seguida vacinados. Os autores demonstraram que linfócitos T CD4⁺ multifuncionais (ou seja, células T produtoras de ≥ 2 citocinas simultaneamente) foram geradas no 21º dia após a exposição ao DENV-1 e se manteve no 42º ou mais dias. Interessante, os linfócitos T multifuncionais aumentavam em indivíduos que não apresentaram viremia comparados aos virêmicos. Os autores discutem que a presença de células T multifuncionais, juntamente com anticorpos neutralizantes, são parâmetros de como uma resposta imune protetora gerada à vacina deve ser ([Lindow et al., 2012](#)).

De acordo com nossos resultados, a coinfeção DENV/ZIKV parece induzir um perfil de linfócitos T CD4⁺ menos inflamatório comparado às monoinfecções DENV ou ZIKV. Se esta baixa frequência de linfócitos T CD4⁺ efetoras multifuncionais poderia interferir no controle do vírus não saberemos, porque não vimos a especificidade antigênica dessas células. Outra questão importante é entender o impacto desse dado no desenvolvimento de resposta imunológica de memória específica ou de reatividade cruzada. É possível

especular que o perfil menos inflamatório dos linfócitos T CD4⁺ na coinfeção seja momentâneo, visto que observamos na fase aguda das infecções, uma menor magnitude da resposta celular ao NS1 dos 4 sorotipos de DENV em relação aos doadores saudáveis expostos ao DENV. Assim como outros grupos de pesquisa, nosso grupo publicou em 2001 que a resposta proliferativa à mitógenos e à antígenos do dengue era muito reduzida em pacientes infectados na fase aguda, mas que na fase de convalescência, essa resposta era reestabelecida (Azeredo et al., 2001). Sendo assim, nossos dados indicam que na fase aguda da infecção há um estágio de imunossupressão da resposta específica. Esperamos em estudos futuros confirmar esses dados. Para isso deveremos dispor de um número maior de pacientes, assim como ser capaz de avaliar a especificidade das respostas celulares. Além disso, seria necessário realizar uma análise longitudinal nos pacientes, a fim de que possamos entender a dinâmica da resposta imune celular nas fases agudas e convalescentes.

Em mãos aos dados obtidos neste estudo, especulamos que existe uma diferença da ativação da resposta celular em indivíduos infectados pelo DENV ou ZIKV comparado aos coinfectados DENV/ZIKV, principalmente em relação a capacidade multifuncional dos linfócitos T CD4⁺. Na coinfeção, uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺ poderia resultar em dois cenários distintos. Primeiro, menos células pró-inflamatórias poderiam levar à um menor controle da infecção, assim como a uma resposta imunológica de memória menos eficiente. Por outro lado, menos células pró-inflamatórias poderiam levar à um desfecho clínico mais brando, já que a imunopatogênese das arboviroses está muito relacionada com a desregulação da resposta imune e produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, outros estudos serão necessários para a confirmação destas hipóteses.

Nós demos prosseguimento ao nosso estudo, agora avaliando a resposta de memória ou a imunidade de pessoas expostas ao ZIKV após 2-3 anos da infecção primária. A maioria dos estudos científicos compartilham os achados de que a imunidade prévia ao DENV contribui à imunidade ao ZIKV. Delgado e colaboradores (2018) demonstraram níveis mais altos de anticorpos anti-ZIKV neutralizantes em doadores imunes ao DENV comparado aos não-imunes. Mais tarde, Tonnerre e colaboradores (2020) demonstraram que a exposição prévia

ao DENV em mulheres não-grávidas foi associada à detecção precoce e à níveis plasmáticos mais elevados de IgG anti-ZIKV e que, o surgimento de anticorpos neutralizantes foi paralelo à detecção de IgG anti-ZIKV. Notavelmente, amostras de plasma com os títulos mais altos de IgG anti-ZIKV também apresentaram mais anticorpos neutralizantes, principalmente em pacientes imunes ao DENV.

Um fato ainda bastante intrigante nos estudos da imunopatogênese da zika é de como se dá o envolvimento dos mecanismos imunológicos antivirais durante a infecção pelo ZIKV na gestação? Ainda, qual seria a consequência da ativação da resposta imune da mãe sobre o desfecho clínico de seu filho?

[Brown e colaboradores \(2019\)](#) demonstraram que camundongos fêmeas gestantes imunes ao DENV, a infecção pelo ZIKV levou a um aumento significativo do dano placentário e da frequência de trofoblastos infectados, o que restringiu o crescimento fetal. Por outro lado, em mulheres gestantes com RT-PCR positivo para ZIKV, [Halai e colaboradores \(2017\)](#) sugeriram que a SCZ não foi associada à existência prévia de anticorpos anti-DENV.

De acordo com nossos dados, 81% (17/21) das mães infectadas pelo ZIKV na gestação apresentavam IgG anti-ZIKV, assim como IgG anti-DENV, sugerindo exposição prévia ao DENV. O grande limitante envolvendo os kits de diagnóstico sorológico comerciais disponíveis no mercado é a reatividade cruzada com anticorpos direcionados para outros flavivírus. Como alternativa, são avaliados anticorpos neutralizantes pelo teste de neutralização por redução de placas, o PRNT. Assim, para nos certificar da especificidade dos anticorpos detectados em nossa coorte, ainda será necessária a realização de ensaios de PRNT nestas amostras.

O primeiro estudo a avaliar o envolvimento dos linfócitos T na infecção materna e fetal pelo ZIKV durante gestação foi feito por [Regla-Nava e colaboradores \(2018\)](#). Os autores utilizaram camundongos infectados sequencialmente por DENV e ZIKV e demonstraram que linfócitos T CD8+ de reatividade-cruzada tendem a se expandir no baço e na decídua materna de animais imunes ao DENV. De forma interessante, a depleção das células T CD8+ resultou no aumento da infecção placentária e fetal pelo ZIKV, seguida de morte fetal. Os autores concluíram que a imunidade prévia ao DENV protege os

animais da infecção pelo ZIKV durante a gravidez, e que os linfócitos T CD8+ são muito importantes nesta proteção cruzada.

[Reynolds e colaboradores \(2020\)](#) foram os pioneiros na avaliação da resposta imunológica específica ao ZIKV em mulheres grávidas. Semelhante ao nosso estudo, grande parte das mães tinham histórico de infecção pelo DENV. Os autores demonstraram que linfócitos T apresentaram respostas efetoras multifuncionais após estimulação com antígenos das proteínas E e NS1 do ZIKV e respostas imunoreguladoras após estimulação com antígenos das proteínas NS5 e C do ZIKV. Segundo os autores, diferentes proteínas virais induzem respostas imunológicas diferentes, algumas pró- e outras anti-inflamatórias, o que poderia impactar na imunopatogênese da zika. Em nosso estudo, não ficou claro se crianças com SCZ nasceram de mães com uma resposta imunológica celular diferente daquelas que tiveram filhos assintomáticos. No futuro, pretendemos incluir amostras agudas de mulheres grávidas para melhor avaliar essa questão.

Assim como a citocina IL-2, IL-7 controla a proliferação, diferenciação e homeostase de linfócitos T naive e de memória ([Ma et al., 2006](#)). Ambas, IL-2 e IL-7 apresentam a cadeia γ (IL-2R γ e IL-7R γ ou CD132) combinada às cadeias de alta afinidade, a cadeia β do receptor de IL-2R (IL-2R β ou CD122) e a cadeia α do receptor de IL-2R (IL-2R α ou CD25). Ainda, a cadeia α do receptor de IL-7 (IL-7R α ou CD127). A ligação da IL-7 ao CD127 resulta no aumento da regulação de moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e aumento da sinalização mediada pelo receptor de célula T, o TCR, induzindo proliferação e produção de IL-2 por linfócitos T recém-ativados ([Fry et al., 2001](#); [Fry et al., 2005](#)). Após ativação antigênica, CD127 é perdido da superfície celular ([Park et al., 2004](#)). Durante infecções virais, diferentes subpopulações de linfócitos T podem ser distinguidas pelos níveis de expressão de CD127. Em geral, linfócitos T CD127^{low} encontram-se predominantes na fase aguda ([Boettler et al., 2006](#); [Paiardini et al., 2005](#); [van Leeuwen et al., 2005](#)), enquanto durante a fase de transição com geração das células T de memória, os linfócitos T CD127^{low} desaparecem gradualmente e voltam as células T CD127^{high}, que são mantidas estáveis ao longo do tempo ([Kaech et al., 2003](#); [Schluns et al., 2000](#); [Tan et al., 2001](#); [Fuller et al., 2005](#); [Lan et al., 2005](#)). Em nosso estudo, observamos uma alta frequência de linfócitos T

CD4+CD127^{low} comparado aos CD4+CD127^{high} nas mães e crianças com histórico de infecção pelo ZIKV. Estudo realizado por Liu e colaboradores (2006) descreveu uma subpopulação de linfócitos T reguladores (Treg) CD4+FoxP3+CD127^{low}. Neste caso, o fator de transcrição FoxP3 parece reprimir a região promotora do gene que codifica CD127, o que leva à expressão reduzida do marcador nos linfócitos T reg. É possível então que parte da subpopulação de linfócitos T CD4+CD127^{low} observadas em nossos pacientes, sejam linfócitos T reguladores, embora outros ensaios utilizando marcadores específicos das Treg deverão ser realizados para a confirmação desta hipótese.

Em relação a expressão de CD127 nos linfócitos T CD8+ estudo realizado por [Cellerai e colaboradores \(2010\)](#) demonstrou que a aquisição de CD127 está associado com a capacidade proliferativa dos linfócitos T CD8+, em detrimento da capacidade citotóxica. Corroborando os achados de [Cellerai e colaboradores \(2010\)](#), estudos em camundongos ([Kaeck et al., 2003](#)) e humanos ([Boettler et al., 2006](#); [Paiardini et al., 2005](#); [van Leeuwen et al., 2005](#)) observaram que a expressão de CD127 tem sido relacionada à proliferação de linfócitos T CD8+ IL-2+ precursores de memória após estimulação *in vitro* policlonal ou específica.

A combinação do marcador extracelular CD127 com os marcadores intracelulares T-bet e GATA-3 nos linfócitos T CD4+ e CD8+, nos permitiu avaliar concomitantemente a polarização Th1/Tc1 ou Th2/Tc2, assim como o *status* de diferenciação dos linfócitos T naives e efetores/memória. Em [1999, Chaturvedi e colaboradores](#) observaram uma resposta predominante do tipo Th1 em 66% dos pacientes infectados pelo DENV classificados como DF, enquanto a resposta do tipo Th2 foi observada em 71% dos pacientes com FHD grau IV, indicando um possível papel dos linfócitos Th2 na imunopatogênese da FHD. [Pardy e colaboradores \(2017\)](#) demonstraram que a infecção pelo ZIKV em modelo murino induziu aumento da resposta de linfócitos T CD4+ com perfil Th1, através da alta expressão do fator de transcrição T-bet, associado ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-2.

Em nosso estudo, observamos frequências aumentadas de subpopulações de linfócitos T CD127^{high}T-bet⁺GATA-3⁺ em mães e crianças com histórico de infecção pelo ZIKV. Ainda não compreendemos qual é o significado

clínico ou imunológico deste dado, nem o impacto dessas subpopulações na imunidade humoral e celular específica ao ZIKV. É possível que a alta frequência de linfócitos T CD127^{high}T-bet-GATA-3+, perfil Th2/Tc2 possam constituir um subconjunto de linfócitos T de memória que desempenham papel crucial no controle da inflamação e desenvolvimento de resposta humoral em indivíduos expostos ao ZIKV, uma vez que essas subpopulações são capazes de secretar níveis mais altos de citocinas relacionadas com as respostas humorais. De fato, a produção de anticorpos neutralizantes tem sido associada com o controle da replicação viral e à proteção contra infecções secundárias por ZIKV em humanos (Robbiani et al., 2017; Stettler 750 et al., 2016; Wang et al., 2016; Swanstrom et al., 2016; Fernandez et al., 2017; 751 Andrade et al., 2019), macacos *rhesus* (Moreno et al., 2019) e camundongos (Dowd et al., 2016; Larocca et al., 2016; Stettler et al., 2016; Sapparapu et al., 2016).

É importante lembrar que embora não estejamos estudando a infecção aguda na gestação, nossos dados refletem um *imprint* do que provavelmente ocorreu na infecção aguda. Uma gravidez bem-sucedida depende da capacidade do sistema imunológico materno de alterar-se, se adaptando a cada estágio do desenvolvimento fetal (Mor & Cardenas, 2010). Três estados imunológicos distintos são observados na gestação: primeiro, um estágio pró-inflamatório associado à implantação e formação da placenta; segundo, um estágio anti-inflamatório que está associado ao crescimento fetal; e terceiro, um segundo estágio pró-inflamatório responsável pelo início do parto (Mor & Cardenas, 2010; Mor et al., 2011). Grande parte das mães de nossa coorte foram infectadas pelo ZIKV no segundo semestre de gestação, fase esta em que é observada uma resposta imunológica com perfil anti-inflamatório, o que poderia estar associado com a indução preferencial de linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória apresentando perfil Th2 e Tc2, respectivamente.

Estudo realizado por Ricciardi e colaboradores (2017) descreveu que a resposta de linfócitos T ao ZIKV aparecem no sétimo dia após o início dos sintomas, com um pico no 21º dia e os linfócitos T de memória foram detectáveis até 148º dia após infecção. Em contraste, estudo envolvendo uma coorte italiana composta por pacientes agudos infectados por ZIKV ou DENV, assim como controles saudáveis, observou que a infecção aguda pelo ZIKV ativou linfócitos

T CD4⁺ e CD8⁺, no entanto, os autores observaram que os pacientes ZIKV mostraram uma frequência mais baixa de linfócitos T_{CM} CD4⁺ em comparação com os pacientes DENV e controles saudáveis, e uma frequência mais alta de linfócitos T_{EM} CD4⁺ e T_{EMRA} CD4⁺. Além disso, os autores observaram que a infecção pelo ZIKV estava associada com a redução de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ quando comparado ao grupo DENV ou controle. Portanto, os autores sugerem que a infecção pelo ZIKV é caracterizada pela diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células efetoras e pela baixa frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (Cimini et al., 2017).

A atividade citotóxica é um dos componentes-chaves para uma imunidade protetora antiviral. Estudo realizado por Grifoni e colaboradores (2018) utilizando uma coorte de doadores na fase de convalescência da infecção pelo ZIKV e após estimulação com antígenos específicos, demonstrou que linfócitos T CD8⁺ ZIKV-específicos são caracterizados por uma assinatura polifuncional com produção de IFN- γ , *up* regulação de genes que codificam TNF- α , receptores de TNF e marcadores de ativação relacionados, como CD69, bem como uma assinatura citotóxica caracterizada por forte *up* regulação de genes que codificam granzima B e CRTAM (*cytotoxic and regulatory T cell molecule*). Esta assinatura é estável e não é influenciada pelo histórico de exposição ao DENV, localização geográfica ou tempo de coleta de amostras pós-infecção (período de 1 a 2 anos) (Grifoni et al., 2018).

Em nosso estudo, a frequência de linfócitos T CD4⁺, mas não de linfócitos T CD8⁺, expressando CD107a foi observada após estimulação *in vitro* com peptídeos específicos ao ZIKV. Duangchinda e colaboradores (2010) demonstraram uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺CD107a⁺ específicos a antígenos de DENV em pacientes DF quando comparados aos pacientes FHD. De acordo com os nossos dados, especulamos que a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ é altamente ativada nos estágios iniciais da infecção pelo ZIKV, enquanto os linfócitos T CD4⁺ CD107a⁺ persistem por mais tempo.

De forma similar, após estimulação *in vitro* com os megapools de ZIKV, observamos uma maior magnitude de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ quando comparados aos linfócitos T CD8⁺. Corroborando o estudo de Lai e

[colaboradores \(2018\)](#), após estimulação com peptídeos direcionados para proteínas do ZIKV, os linfócitos T CD4⁺ apresentam capacidade de degranulação e produção de IFN- γ , o que não foi observado em linfócitos T CD8⁺. Diante disso, sugerimos que a atividade citotóxica e pró-inflamatória de linfócitos T CD8⁺ são aumentados nos estágios iniciais da infecção pelo ZIKV, mas não persistem na fase de resolução da doença. No entanto, para comprovação dessa hipótese será necessário realizar uma análise longitudinal de pacientes infectados pelo ZIKV.

[Lai e colaboradores \(2018\)](#) a partir da avaliação de 5 indivíduos viajantes, dentre eles duas grávidas, que retornaram aos EUA com infecção aguda sintomática pelo ZIKV e foram acompanhadas até 400 dias após a infecção, os autores reportaram uma forte ativação de linfócitos T CD8⁺ DENV-específicos de reatividade cruzada e uma ativação moderada de linfócitos T CD4⁺ DENV-específicos de reatividade cruzada na fase inicial da infecção por ZIKV. Além disso, os linfócitos T CD4⁺ foram ativados moderadamente e produziram citocinas antivirais após estimulação com peptídeos da proteína C, prM, E e NS5 do ZIKV em todos os pacientes. Por outro lado, os linfócitos T CD8⁺ foram maciçamente ativados, mas os linfócitos T CD8⁺ funcionais e específicos contra os peptídeos das proteínas C, prM, E e NS5 do ZIKV eram geralmente ausentes ou de baixa frequência. Achados semelhantes foram observados por [Valentine e colaboradores \(2020\)](#). Os autores avaliaram a geração de linfócitos T de memória específicos ao ZIKV em camundongos imunocompetentes e descreveram que apenas linfócitos T CD4⁺ específicos ao ZIKV foram expandidos na infecção secundária. Além disso, destacaram que as respostas de linfócitos T CD8⁺ foram compostas por células efectoras de vida curta e não precursoras de memória, indicando que as respostas de linfócitos T CD8⁺ de memória são prejudicadas após a infecção primária por ZIKV.

O papel protetor de linfócitos T CD8⁺ na zika tem sido demonstrado por diferentes estudos em modelos experimentais de camundongo. Estudo realizado por [Huang e colaboradores \(2017\)](#) demonstrou que a transferência adotiva de linfócitos T CD8⁺ específicos ao ZIKV protege os animais da infecção, enquanto a depleção deste tipo celular resulta em aumento da infecção pelo ZIKV e maior mortalidade dos animais. Além disso, foi demonstrado que linfócitos T CD8⁺ de

reatividade-cruzada expandem em camundongos imunes ao DENV após infecção pelo ZIKV, reduzindo eficientemente os títulos de ZIKV (Wen et al., 2017). No entanto, linfócitos T CD8+ parecem ser importantes mediadores da neuropatogênese mediada por ZIKV em camundongos (Manangeeswaran et al., 2016; Jurado et al., 2018).

A maioria dos linfócitos T CD4+ específicos ao DENV eram caracterizados pelo perfil de células de memória do tipo T_{EMRA} em doadores (Weiskopf et al., 2015). Patil e colaboradores (2018) revelaram que os linfócitos T CD4+ T_{EMRA} em pacientes infectados pelo DENV expressam diversos genes associados à citotoxicidade e à função coestimulatória, quando comparados com linfócitos T CD4+ de memória central T_{CM} e memória efetora T_{EM}. Nossos dados indicam que a maior frequência de linfócitos T CD4+IFN γ +específicos ao ZIKV foram do tipo T_{EMRA}.

Nosso estudo descreve pontos importantes de relevância imunológica, clínica e epidemiológica, particularmente em relação aos linfócitos T CD8+ de memória específicos ao ZIKV que são gerados, mas mantidos por um curto período. Também evidenciarmos que as respostas de linfócitos T específicas ao ZIKV nas mães parecem não ter sido diferenciadas na fase aguda e que, portanto, não estariam relacionadas ao desfecho clínico dos bebês.

A imunidade humoral é um dos braços da resposta imune do hospedeiro. Além disso, a presença de anticorpos específicos contra determinado patógeno em amostras clínicas é um dos parâmetros chaves para confirmação do diagnóstico clínico do paciente. No intuito de minimizar a baixa sensibilidade e especificidade observada nos kits sorológicos comerciais para zika, principalmente devido à reatividade cruzada entre os IgG anti-ZIKV e IgG anti-DENV levando à uma detecção “falsa-positiva”, nos propusemos a prever, sintetizar e validar peptídeos lineares de linfócitos B das regiões das proteínas E, NS1 e NS5 do ZIKV. Para isso, utilizamos as mesmas amostras de soro de mães com histórico de infecção pelo ZIKV que foram coletadas após 2 a 3 anos de infecção aguda. Essas amostras foram escolhidas porque eram as disponíveis, todas tinham confirmação da infecção pelo ZIKV por RT-PCR na fase aguda e, também, porque constituía um grupo bastante interessante para

este tipo de avaliação. Um limitante desse estudo é que não dispúnhamos de um grupo com sorologia negativa para dengue, lembrando que o Brasil é uma área endêmica de infecção por DENV há mais de 40 anos. Como alternativa, selecionamos em nosso biorepositório um grupo composto por indivíduos agudos e imunes ao DENV das epidemias de 2007, 2008 e 2010, anos em que ZIKV não circulava no território brasileiro.

[L'Huillier e colaboradores \(2017\)](#) compararam os resultados obtidos pelos ensaios comerciais IgM e IgG anti-ZIKV da marca comercial Euroimmun com os obtidos pelo MAC-ELISA e pelo teste de neutralização por redução de placas (PRNT). Os ensaios comerciais de IgM e IgG da Euroimmun, quando combinados, mostraram uma boa especificidade (92,5%), porém, uma sensibilidade bem abaixo da ideal (39,5%) em comparação ao MAC-ELISA. Mas, a sensibilidade e a especificidade dos ensaios combinados IgM e IgG anti-ZIKV da Euroimmun quando comparada às do PRNT foi significativamente maior (83% a 92%). Segundo os autores, os ensaios comerciais disponíveis para o diagnóstico sorológico de rotina de zika precisam ser aprimorados quanto à sensibilidade e especificidade ([L'Huillier et al. 2017](#)).

Outro fator a ser lembrado, a escolha de qual classe de anticorpos deverá ser utilizada como parâmetro de diagnóstico precisa levar em conta os dias pós-infecção. Neste contexto, [Amrun e colaboradores \(2019\)](#) relataram que anticorpos IgM anti-ZIKV são detectados precocemente na fase aguda da doença (entre 2 a 7 dias), atingem um pico no início da fase de convalescência (entre 10 a 14 dias), seguindo de diminuição na fase de recuperação (entre 3 meses a 1 ano). Os autores também detectaram um pico nos títulos de anticorpos IgG anti-ZIKV no início da fase de convalescência, que se mantiveram ainda detectáveis 1 ano após infecção (Amrun et al., 2019).

A possibilidade de usar epítomos de ZIKV altamente conservados, capazes de distinguir outras infecções por flavivírus relacionados como o DENV, vem sendo demonstrado em estudos anteriores ([Miagostovich et al., 1999](#); [Steinhagen et al., 2016](#); [Wong et al., 2017](#); [Amrun et al., 2019](#)). Na tentativa de agilizar o processo de identificação de epítomos imunogênicos, análises computacionais são uma alternativa, pois apontam para vários epítomos

potenciais através de uma análise de predição *in silico* (Vaughan et al., 2010). Utilizando as ferramentas computacionais BepiPred 1.0 e EMINI *Surface Accessibility prediction*, 22 peptídeos lineares das regiões das proteínas E, NS1 e NS5 do ZIKV foram preditas e os graus de conservação foi avaliado através da comparação das sequências dos epítomos com a das proteínas homologas de outros flavivírus. Dos 22 peptídeos, 17 epítomos apresentaram grau de conservação superior a 50% entre os sorotipos DENV (variando de 50 a 92%) e cinco apresentaram grau de conservação inferior a 50% entre os sorotipos DENV (variando de 19 a 38%). Dos 17 peptídeos mais conservados, nós sintetizamos cinco. A discussão dos dados será agora relacionada aos dados de reconhecimento desses peptídeos nas amostras de plasma dos grupos de pacientes apresentados acima.

Dois peptídeos obtidos da proteína E do ZIKV, peptídeo E₁₅₈₋₁₇₁ localizado na região do domínio I (EDI) e o E₃₆₀₋₃₆₇, no domínio III (EDIII) foram avaliados. No entanto, as amostras dos pacientes com histórico de ZIKV não reconheceram esses peptídeos. Denis e colaboradores (2019) demonstraram que o antígeno da região EDIII do ZIKV é promissor e, portanto, tem potencial para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico (Denis, et al. 2019). Já estudo realizado por Premkumar e colaboradores (2017), baseado em modelagem de epítomos, projetou dois antígenos recombinantes exibindo regiões antigênicas únicas nos domínios EDI e EDIII da proteína E do ZIKV. Ambos os antígenos EDI e EDIII foram consistentemente detectados pela IgG anti-ZIKV em soros imunes ao ZIKV. No entanto, esses antígenos também foram reconhecidos em soros imunes ao DENV, sugerindo que estava ocorrendo reação-cruzada aos antígenos EDI e EDIII do ZIKV em amostras de pacientes expostos ao DENV (Premkumar et al.,2017).

Um dos peptídeos avaliados neste estudo foi obtido a partir da proteína NS5. Entre todas as proteínas não estruturais dos flavivírus, NS5 é a mais conservada e apresenta funções cruciais, incluindo participação na replicação do RNA viral e supressão da imunidade inata do hospedeiro. De acordo com os dados obtidos envolvendo o peptídeo NS5₂₄₅₋₂₅₈, não observamos potencial de diagnóstico diferencial em nossa população de estudo. De fato, o potencial da proteína NS5 no diagnóstico sorológico tem sido pouco explorado, no entanto,

estudo realizado por [Zhao e colaboradores \(2019\)](#) destaca o envolvimento desta proteína na resposta imune inata a partir da identificação de regiões NS5₁₁₋₉₀ e NS5₃₇₀₋₄₀₆ que apresentam NLS, que são sinais essenciais à localização nuclear da NS5 do ZIKV. Dados adicionais demonstraram que a localização nuclear da NS5 do ZIKV participa predominantemente da supressão da ativação mediada pelo fator regulador do interferon 3 (IRF3) na transcrição dos IFN tipo I (IFN-I) e inibição da resposta a jusante do IFN-I. Esses resultados sugerem que a localização subcelular do NS5 é importante por sua função na supressão imunológica inata, o que fornece novas informações sobre a patogênese do ZIKV.

[Settler e colaboradores \(2016\)](#) descreveram que a quantidade de proteína NS1 secretada na infecção pelo ZIKV era 10x inferior a quantidade secretada na infecção pelo DENV ([Settler et al., 2016](#)). Desta forma, para garantirmos a detecção dos epítomos de NS1 do ZIKV, assim como os das proteínas E e NS5, optamos por utilizar amostras de plasma diluída na proporção 1:5 em nossos ensaios.

Muitos estudos têm descrito a capacidade de antígenos da proteína NS1 diferenciarem as infecções entre ZIKV e DENV ([Wong, et al., 2017](#); [Steinhagen, et al., 2016](#); [Balmaseda, et al., 2017](#); [Lee, et al., 2018](#); [Freire, et al., 2017](#)). Aqui, selecionamos dois peptídeos da região NS1 para serem avaliados, NS1₈₋₁₅ e NS1₁₈₈₋₁₉₆. De acordo com nossos dados, 25% dos doadores imunes ao ZIKV reconheceram NS1₈₋₁₅, que também foi reconhecido por 5,6% dos doadores imunes ao DENV. Interessante, a magnitude da resposta a esse peptídeo diferenciou significativamente os doadores imunes ao ZIKV e ao DENV. Semelhantes aos epítomos das proteínas E e NS5, o peptídeo NS1₁₈₈₋₁₉₆ não foi reconhecido nas amostras dos pacientes com histórico de ZIKV ou DENV.

A proteína NS1 parece ter características que a tornam um alvo potencial para ser utilizado neste tipo de abordagem, como mostram estudos anteriores. [Mora-Cárdenas e colaboradores \(2020\)](#) demonstraram que a NS1 recombinante é uma opção válida para a detecção de anticorpos contra flavivírus ([Mora-Cárdenas et al., 2020](#)). Estudo realizado por [Song e colaboradores \(2016\)](#) demonstrou que na posição 315 da NS1 do ZIKV, há um resíduo de glutamato

carregado negativamente, apontado como exclusivo para ZIKV. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram na posição 315 da NS1 do DENV, um resíduo serina. Por consequência, são observadas diferenças no potencial eletrostático da superfície da NS1 do ZIKV em comparação aos de outros flavivírus (Song et al., 2016). A estrutura cristalina da NS1 ZIKV revelou uma região formada pelos resíduos 108-129 no domínio da alça flexível, que não havia sido descrita anteriormente em outros flavivírus (Brown et al., 2016).

Utilizando as mesmas ferramentas de predição utilizadas em nosso estudo, Lee e colaboradores (2018) identificaram 33 epítomos lineares de linfócitos B com 15-30 aminoácidos de comprimento que recobriam toda a sequência de aminoácidos da proteína NS1. Para a realização da metodologia de validação, os autores utilizaram a diluição da amostra de soro de 1:500. A capacidade de ligação foi avaliada a partir da utilização de 20 soros positivos e 6 negativos. O *cut off* foi calculado a partir da média da DO do controle negativo. Após a triagem destes peptídeos, os autores observaram que os peptídeos Z8 e Z14 apresentaram níveis mais altos de atividade de ligação em soros de doadores infectados pelo ZIKV, sem detecção de reatividade cruzada com outros flavivírus. Ao compararmos as sequências dos peptídeos ZIKV-específicos utilizados no estudo de Lee e colaboradores (2008) com os utilizados em nosso estudo, observamos que o nosso peptídeo NS1₍₈₋₁₅₎ está contido no peptídeo Z1 do estudo de Lee e colaboradores (DVGCSVDFSKKETRCGTG), embora os autores não observaram capacidade de detecção de IgG anti-Z1 após utilização de um *pool* de soros ZIKV positivos.

Outro estudo bastante semelhante ao nosso, investigou a resposta de anticorpos do tipo IgG em pacientes brasileiros adultos na fase aguda da infecção pelo ZIKV, incluindo 7 mulheres grávidas. Os autores demonstraram que seis peptídeos lineares específicos do ZIKV foram detectados na fase aguda da infecção pelo ZIKV. Quatro deles (dois da proteína E e dois da NS1) foram fortemente reconhecidos pelos anticorpos de pacientes infectados pelo ZIKV, mas não pelos pacientes infectados pelo DENV. Notavelmente, as mulheres grávidas apresentaram reconhecimento de uma região específica da proteína NS1 do ZIKV, NS1₁₇₋₃₄, que segundo os autores, poderia ser um marcador sorológico para detecção precoce de ZIKV, especialmente em mulheres grávidas

([Kam et al., 2019](#)). Diferentemente do nosso estudo, os autores utilizaram as ferramentas de predição I-Tasser e as disponibilizadas no PDB para a realização das predições de peptídeos lineares. Além disso, utilizaram pacientes agudos infectados pelo DENV ou ZIKV, além de amostras convalescentes (2 a 3 meses pós infecção) das mulheres grávidas.

Um ponto inovador do nosso estudo foi a presença de mães com histórico de ZIKV na gravidez que tiveram filhos com diferentes desfechos clínicos, alguns assintomáticos e outros com a SZC. Obviamente nos perguntamos se existiria uma diferença na magnitude de resposta entre esses dois subgrupos de mães. No entanto, não observamos diferenças significativas entre os subgrupos, nem mesmo para o peptídeo NS1₈₋₁₅.

Os anticorpos da classe IgG são os únicos capazes de cruzar a placenta materna e chegar ao feto, protegendo o bebê enquanto sua resposta humoral é ainda ineficiente. A transferência de IgG depende dos níveis maternos de IgG total, dos anticorpos específicos e das subclasses de IgG. As subclasses IgG1 e a IgG3 com mais eficiência através da placenta do que a subclasse IgG2 ([Palmeira, 2012](#)). [Amrun e colegas \(2019\)](#) demonstraram que pacientes infectados pelo ZIKV apresentavam maiores títulos dos isotipos IgG1 e IgG3 na fase inicial da convalescência, enquanto o isotipo IgG1 aparecia apenas na fase tardia ([Amrun, et al., 2019](#)). Pretendemos em estudos posteriores avaliar subclasses de IgG quanto ao reconhecimento dos peptídeos selecionados em nosso estudo, particularmente o NS1₈₋₁₅.

Estudo realizou uma análise abrangente do repertório de anticorpos IgG frente a toda poliproteína do ZIKV em indivíduos com histórico da infecção. De forma bastante interessante, foram demonstrados um repertório de IgG altamente diversificado, direcionado para as proteínas prM/E, NS1 e NS2B, que aumentou cerca de 10 vezes entre o primeiro e o sétimo dia pós infecção. Além disso, os autores observaram uma maturação da afinidade dos anticorpos contra a proteína E do ZIKV em comparação com NS1 ([Ravichandran, et al., 2019](#)). Assim, é possível que o reconhecimento dos peptídeos selecionados em nosso estudo seja alterado de acordo com a fase da infecção. Amostras longitudinais de pacientes infectados pelo ZIKV nas fases agudas, convalescente e de

recuperação deverão ser avaliadas posteriormente, particularmente com o NS1₈₋₁₅.

Em relação à capacidade de neutralização dos anticorpos específicos para ZIKV, [Amrun e colaboradores \(2009\)](#) observaram que os anticorpos de pacientes nos estágios convalescentes precoce e tardio da infecção pelo ZIKV apresentavam uma capacidade eficiente de neutralização do ZIKV (71-93%). Por outro lado, uma fraca capacidade de neutralização pelos IgG anti-ZIKV (37-47%) foi observada nos últimos estágios de recuperação desses pacientes. Curiosamente, os plasmas dos pacientes neutralizaram minimamente o DENV, indicando a especificidade desses anticorpos ([Amrun et al., 2019](#)). Como perspectiva, pretendemos determinar a atividade neutralizante dos anticorpos anti-peptídeos lineares específicos do ZIKV, principalmente aqueles direcionadas à região NS1₈₋₁₅.

[Stettler e colaboradores \(2016\)](#) estabeleceram um ensaio muito interessante denominado "ELISA do bloqueio de ligação da NS1 do ZIKV". A medida é feita pela avaliação da capacidade dos anticorpos séricos bloquear a ligação de um anticorpo monoclonal anti-NS1 do ZIKV "grudada" em fase sólida. Essa abordagem mostrou ser mais específica do que os ELISA tradicionais. Mais tarde, estudo validou esse teste em coortes multicêntricas de pacientes estratificados por exposição à infecção por DENV e ZIKV, *status* imunológico e época da coleta de amostras, confirmando a alta especificidade e sensibilidade do ensaio ([Balmaseda et al., 2017](#)).

Baseado nos dados obtidos ao longo da tese, podemos destacar algumas importantes contribuições desse estudo: *(i)* na coinfeção por DENV e ZIKV, a resposta imunológica mediada por linfócitos T CD4⁺ foi menos inflamatória do que nas monoinfecções por DENV ou ZIKV; *(ii)* linfócitos T CD4⁺ específicos ao ZIKV de memória de longa duração foram demonstrados em doadores com histórico de infecção pelo ZIKV há mais de 2 anos, diferente dos linfócitos T CD8⁺ de memória específicos ao ZIKV; e *(iii)* a magnitude da atividade de ligação do peptídeo NS1₈₋₁₅ do ZIKV aos IgG presentes em doadores infectados pelo ZIKV foi maior do que nos doadores infectados pelo DENV, indicando um candidato potencial para ensaios diagnósticos futuros.

7 CONCLUSÃO

- I. Frequências similares de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CCR5, CX3CR1 e CCR3 nas mono- e coinfeções sugerem semelhanças funcionais e migratórias, independentemente do vírus infectante;
- II. Observamos um perfil menos inflamatório dos linfócitos T CD4⁺ na coinfeção comparado às monoinfeções, sugerindo imunomodulação em decorrência da coinfeção;
- III. Detectamos uma menor magnitude da resposta a NS1 DENV em pacientes agudos com histórico de infecção anterior por dengue, sugerindo uma fase de imunossupressão durante infecção aguda da resposta específica ao NS1 DENV. Doadores saudáveis expostos ao DENV responderam prontamente a NS1 DENV.
- IV. Observamos uma alta frequência de linfócitos T CD4⁺ de perfil Th2 efetora/memória e de linfócitos T CD8⁺ de perfil Th1 *naive*, seguida de linfócitos T CD8⁺ de perfil Tc2 efetora/memória nas mães e crianças, indicando que essas células estariam, de alguma forma, auxiliando a resposta imune humoral de mães e crianças com histórico de infecção pelo ZIKV;
- V. As habilidades de degranulação e produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ foram detectadas nos três grupos de pacientes mesmo após 2-3 anos de infecção, indicando que os linfócitos T CD4⁺ mantêm um perfil de memória de longa duração;
- VI. Por outro lado, as habilidades de degranulação e produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ foram ausentes ou baixos nos três grupos de pacientes após o mesmo período, indicando que os linfócitos T CD8⁺ mantêm um perfil de memória de curta duração quando comparado aos T CD4⁺;
- VII. Demonstramos que os linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} são os principais produtores de IFN- γ .
- VIII. O peptídeo NS1₍₈₋₁₅₎ foi mais reconhecido entre os doadores imunes ao ZIKV do que entre os doadores imunes ou infectados pelo DENV, portanto, a reatividade específica do epítipo linear de células B NS1₍₈₋₁₅₎ pode ser um

primeiro passo para o desenho de um ensaio sorológico específico para ZIKV com base na ligação de anticorpos IgG totais à fase sólida.

8 PERSPECTIVAS

1. Durante epidemias futuras, aumentar o número amostral de pacientes considerando a variedade de combinações de coinfeções entre DENV, ZIKV e CHIKV para avaliação da resposta imune efetora;
2. Avaliar a frequência alélica dos genes de HLA classe I e II com métodos de alta resolução e associar a frequência dos alelos às respostas de linfócitos T multifuncionais na coinfeção pelos arbovírus;
3. Avaliar a resposta imunológica de linfócitos T de memória em amostras de pacientes coinfectados na fase de convalescência e recuperados;
4. Avaliar a resposta imunológica de memória de linfócitos T quanto à produção de citocinas de perfil Th2/Tc2 de mães e crianças com histórico de infecção pelo ZIKV;
5. Avaliar a resposta de memória humoral a partir da caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos B de mães e crianças com histórico de infecção pelo ZIKV após estimulação com peptídeos lineares de linfócitos B para ZIKV.

9 REFERÊNCIAS

- ABBINK, P., Larocca, R. A., De La Barrera, R. A., et al. **Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys.** *Science*. 353(6304):1129-32. doi: 10.1126/science.aah6157. 2016.
- ADIBI, J. J., Zhao, Y., Cartus, A. R., et al. **Placental Mechanics in the Zika-Microcephaly Relationship.** *Cell Host Microbe*. Jul 13;20(1):9-11. doi: 0.1016/j.chom.2016.06.013. 2016.
- AL-AFALEQ, A. I. **Zika Virus Disease.** *Saudi J Med Med Sci*. 5(1):2-8. doi: 10.4103/1658-631X.194260. 2017.
- ALCON, S., Talarmin, A., Debryne, M., et al. **Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections.** *J Clin Microbiol*. 40(2):376-81. 2002.
- ALEXANDER, N., Balmaseda, A., Coelho, I. C., et al. **Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries.** *Trop Med Int Health*; 16: 936–48. 2011.
- AMRUN, S. N., Yee, W. X., et al. **Novel differential linear B-cell epitopes to identify Zika and dengue virus infections in patients.** *Clin Transl Immunology*. 8(7):e1066. Published 2019 Jul 26. doi:10.1002/cti2.1066. 2019.
- ANDERSON, K. B., Gibbons, R. V., Cummings, D. A. et al. **A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand.** *J Infect Dis*. Feb 1;209(3):360-8. doi: 10.1093/infdis/jit436. 2014.
- ANDRADE, P., Gimblet-Ochieng, C., Modirian, F., et al. **Impact of pre-existing dengue immunity on human antibody and memory B cell responses to Zika.** *Nat Commun*. 10:938-50. 2019.
- ANGELO, M.A., Grifoni, A., O'Rourke, P. H. et al. **Human CD4+ T Cell Responses to an Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Parallel Those Induced by Natural Infection in Magnitude, HLA Restriction, and Antigen Specificity.** *J Virol*. Feb 14;91(5). pii: e02147-16. doi: 10.1128/JVI.02147-16. 2017.
- APPANNA, R., Huat, T. L., See, L. L., et al. **Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia.** *Clin Vaccine Immunol*. Aug;14(8):969-77. 2007.
- APPANNA, R., Ponnampalavanar, S., Lum Chai See, L., et al. **Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population.** *PLoS One*. 5(9):e13029. Published 2010 Sep 28. doi:10.1371/journal.pone.0013029. 2010.
- ARRAGAIN, L., Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., et al. **Vertical transmission of dengue virus in the peripartum period and viral kinetics in newborns and breast milk: new data.** *J Pediatric Infect Dis Soc*. 6: 324–31. 2017.
- ATKINSON, B., Hearn, P., Afrough, B., et al. **Detection of Zika Virus in Semen.** *Emerg Infect Dis*. May;22(5):940. doi: 10.3201/eid2205.160107. 2016.
- ATKINSON, B., Thorburn, F., Petridou, C. et al. **Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen, United Kingdom, 2016.** *Emerg Infect Dis*. 23(4):611-615. doi: 10.3201/eid2304.161692. Erratum in: *Emerg Infect Dis*. 2017 Jul;23(7):1228. 2017.
- AZEREDO, E. L., Dos Santos, F. B., Barbosa, L. S., et al. **Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil.** *PLoS Curr*. 10. 2018.
- AZEREDO, E. L., Zagne, S. M., Alvarenga, A. R., et al. **Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(4):437-49. 2006.
- AZEREDO, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., et al. **Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever.** *Immunobiology*. 204(4):494-507. doi:10.1078/0171-2985-00058. 2001.
- BAILEY, M. J., Broecker, F., Duehr, J. et al. **Antibodies Elicited by an NS1-Based Vaccine Protect Mice against Zika Virus.** *mBio*. 10(2): e02861-18. doi: 10.1128/mBio.02861-18. 2019.
- BALMASEDA, A., Stettler, K., Medialdea-Carrera, R., et al. **Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 1;114(31):8384-8389. doi: 10.1073/pnas.1704984114. Epub 2017 Jul 17.
- BALMASEDA, A., Zambrana, J. V., Collado, D., et al. **Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection.** *J Clin Microbiol*. 56(3). pii: e01785-17. doi: 10.1128/JCM.01785-17. 2018.

- BARBA-SPAETH, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., et al. **Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization.** *Nature*. 536(7614):48-53. doi: 10.1038/nature18938. Erratum in: *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):314. 2016.
- BARJAS-CASTRO, M. L., Angerami, R. N., Cunha, M. S., et al. **Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil.** *Transfusion*. Jul; 56(7):1684-8. doi: 10.1111/trf.13681. 2016.
- BAROUCH, D. H., Thomas, S. J., Michael, N. L. **Prospects for a Zika Virus Vaccine.** *Immunity*. 46(2):176-182. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.005. 2017. Review.
- BARRETO, M. L e TEIXEIRA, M. G. **Dengue fever: a call for local, national, and international action.** *Lancet*. Jul 19;372(9634):205. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61069-7.2008.
- BARZON, L., Pacenti, M., Berto, A., et al. **Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016.** *Euro Surveill*. 21(10):30159. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159. 2016.
- BASURKO, C., Matheus, S., Hilderl, H., et al. **Estimating the risk of vertical transmission of dengue: a prospective study.** *Am J Trop Med Hyg*. 98: 1826–32. 2018.
- BELTRAMELLO, M., Williams, K. L., Simmons, C. P., et al. **The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity.** *Cell Host Microbe*. Sep 16;8(3):271-83. doi: 10.1016/j.chom.2010.08.007. 2010.
- BESNARD, M., Lastere, S, Teissier, A, et al. **Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014.** *Euro Surveill*. Apr 3;19(13). pii: 20751. 2014.
- BIDET, K., Dadlani, D. e Garcia-Blanco, M. A. **G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA.** *PLoS Pathog*. Jul 3;10(7):e1004242. doi: 10.1371/journal.ppat.1004242. 2014.
- BINGHAM, A. M., Cone, M., Mock, V., et al. **Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 65(18):475-8. 2016.
- BOGOCH, I. I., Brady, O. J., Kraemer, M. U. G., et al. **Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil.** *Lancet*. Jan 23;387(10016):335-336. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00080-5. 2016.
- BOWEN, J. R., Quicke, K. M., Maddur, M. S., et al. **Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells.** *PLoS Pathog*. Feb 2;13(2):e1006164. doi: 10.1371/journal.ppat.1006164. 2017.
- BRASIL, P., Pereira, JP Jr, Moreira, M. E., et al. **Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro.** *N Engl J Med*. 375(24):2321-2334. 2016a.
- BRASIL, P., Sequeira, P. C., Freitas, A. D., et al. **Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection.** *Lancet*. 387(10026):1482. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30058-7. 2016.
- BRATHEWAITE, D. O., San Martín, J. L., Montoya, R. H, et al. **The history of dengue outbreaks in the Americas.** *Am J Trop Med Hyg*. 87(4):584-93. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0770. 2012.
- BREWOO, J. N., Kinney, R. M., Powell, T. D., et al., **Immunogenicity and efficacy of chimeric dengue vaccine (DENVax) formulations in interferon-deficient AG129 mice.** *Vaccine*. 30(8):1513-20. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.072. 2012.
- BROWN, J. A., Singh, G., Acklin, J. A., et al. **Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy.** *Immunit*. 50:751-62. 2019.
- BROWN, W. C., Akey, D. L., Konwerski, J. R., et al. **Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure.** *Nat Struct Mol Biol*. 23(9):865-867. doi:10.1038/nsmb.3268. 2016.
- BUSCH, M. P., Kleinman, S. H., Tobler, L. H., et al. **Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection.** *J Infect Dis*. 198(7):984-93. doi: 10.1086/591467. 2008.
- BUTRAPET, S., Huang, C. Y., Pierro, D. J., et al. **Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3.** *J Virol*. 74(7):3011-9. 2000.
- CACCAMO, N., Joosten, S. A., Ottenhoff, T. H. M, et al. **Atypical Human Effector/Memory CD4+ T Cells With a Naive-Like Phenotype.** *Front Immunol*. 9:2832. doi: 10.3389/fimmu.2018.02832. 2018. Review.
- CAMPOS, G. S., Bandeira, A. C. e Sardi, S. I. **Zika vírus outbreak, Bahia, Brazil.** *Emerg Infect Dis*. 21:1885-1886. 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M., Blake, A., Mons, S., et al. **Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study.** *Lancet*. 387(10027):1531-1539. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6. 2016
- CAO-LORMEAU, V. M., Roche, C., Teissier, A., et al. **Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013.** *Emerg Infect Dis*. 20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138. 2014.
- CAPEDING, M. R., Tran, N. H., Hadinegoro, S. R., et al. **Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial.** *Lancet*. 384(9951):1358-65. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61060-6. 2014.

- CARNEC, X., Meertens, L., Dejarnac, O., et al. **The phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine receptor CD300a binds dengue virus and enhances infection.** *J. Virol.* 90:92–102. 2015.
- CARRILLO-HERNÁNDEZ, M. Y., Ruiz-Saenz, J., Villamizar, L. J., et al. **Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border.** *BMC Infect Dis.* 18(1):61. doi: 10.1186/s12879-018-2976-1. 2018.
- CAUCHEMEZ, S., Besnard, M., Bompard, P. et al. **Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study.** *Lancet.* 387(10033):2125-2132. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00651-6. 2016.
- CDC – Europe (2015). **ECDC Factsheet about Zika virus disease.** 29 March 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/zika-virus-infection/facts/factsheet>
- CDC- Europa (2015). **Zika virus epidemic in the Americas. potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome.** Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control; 2015. Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>. Accessed January 23, 2020
- CDC. **Dengue-Cuba.** *MMWR.* 1981;30:317.
- CELLERAI, C., Perreau, M., Rozot, V., et al. **Proliferation capacity and cytotoxic activity are mediated by functionally and phenotypically distinct virus-specific CD8 T cells defined by interleukin-7R{alpha} (CD127) and perforin expression.** *J Virol.* 84(8):3868-3878. doi:10.1128/JVI.02565-09. 2010.
- CHATURVEDI, U. C., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., et al. **Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures.** *J Med Virol.* 59(3):335-340. doi:10.1002/(sici)1096-9071(199911)59:3<335::aid-jmv13>3.0.co;2-e. 1999.
- CHAU, T. N., Hieu, N. T., Anders, K. L., et al. **Dengue virus infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese infants.** *J Infect Dis.* 200: 1893–900. 2009.
- CHAVES, B. A., Orfano, A. S., Nogueira, P. M., et al. **Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host.** *J Infect Dis.* 218(4):563-571. doi: 10.1093/infdis/jiy196. 2018.
- CHEN, H. L e TANG, R. B. **Why Zika virus infection has become a public health concern?** *J Chin Med Assoc.* 79(4):174-8. doi: 10.1016/j.jcma.2016.03.001. 2016. Review.
- CHEN, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., et al. **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate.** *Nat. Med.* 3:866–7. 1997.
- CHU, H., George, S. L., Stinchcomb, D. T. et al. **CD8+ T-cell Responses in Flavivirus-Naive Individuals Following Immunization with a Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate.** *J Infect Dis.* 212(10): 1618–1628. doi: 10.1093/infdis/jiv258. 2015.
- CIMINI, E., Castilletti, C., Sacchi, A., et al. **Human Zika infection induces a reduction of IFN-γ producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector Vδ2 T-cells.** *Sci Rep.* 7(1):6313. doi: 10.1038/s41598-017-06536-x. 2017.
- CLEMENTS, D. E., Collier, B. A.; Lieberman, M.M., et al. **Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: Immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys.** *Vaccine.* 28, 2705–2715. 2010.
- CLETON, N. B., Godeke, G. J., Reimerink, J, et al. **Spot the difference-development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers.** *PLoS Negl Trop Dis.* 9(3):e0003580. 2015.
- CLYDE, K., Kyle, J. L., Harris, E. **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.** *J Virol.* 80(23):11418-31. 2006. Review.
- COLT, S., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., et al. **Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review.** *PLoS Negl Trop Dis.* 11(4):e0005528. doi: 10.1371/journal.pntd.0005528. eCollection 2017 Apr. 2017.
- COUNOTTE, M. J., Kim, C. R., Wang, J., et al. **Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review.** *PLoS Med.* 15(7):e1002611. doi: 10.1371/journal.pmed.1002611. 2018. Review.
- COUVELARD, A., Marianneau, P., Bedel, C., et al. **Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis.** *Hum. Pathol.* 30:1106–10. 1999.
- DANKO, J. R., Kochel, T., Teneza-Mora, N., et al. **Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 849–856. 2018.
- DAVIDSON, A., Slavinski, S., Komoto, K., et al. **Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65(28):716-7. doi: 10.15585/mmwr.mm6528e2. 2016.

- de ALWIS, R., Bangs, D. J., Angelo, M. A. **Immunodominant Dengue Virus-Specific CD8+ T Cell Responses Are Associated with a Memory PD-1+ Phenotype.** *J Virol.* 90(9):4771-4779. doi: 10.1128/JVI.02892-15. 2016.
- DE ALWIS, R., Smith, S. A., Olivarez, N. P., et al. **Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(19):7439-44. doi: 10.1073/pnas.1200566109. 2012.
- DE FATIMA, M. V. A., van der Linden, V., Brainer-Lima, A. M., et al. **Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study.** *BMJ.* 353:i1901. doi: 10.1136/bmj.i1901. 2016.
- DE OLIVEIRA, C. S. e Vasconcelos, P. F. **Microcephaly and Zika virus.** *J Pediatr (Rio J).* Mar-Apr;92(2):103-5. doi: 10.1016/j.jped.2016.02.003. 2016.
- DE OLIVEIRA, W. K., Cortez-Escalante, J., de Oliveira, W. T et al. **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.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65: 242-247. 2016.
- DE PAULA, Freitas B. F., de Oliveira, J. R. D, Prazeres, J., et al. **Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil.** *JAMA Ophthalmol.* 134(5):529-535. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0267. 2016.
- DEJNIRATTISAI, W, Wongwiwat, W, Supasa, S., et al. **A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus.** *Nat Immunol.* 16(2):170-177. doi: 10.1038/ni.3058. Erratum in: *Nat Immunol.* 2015 May;16(5):544. *Nat Immunol.* 2015 Jul;16(7):785. 2015.
- DEJNIRATTISAI, W., Jumnainsong, A., Onsirakul, N., et al. **Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans.** *Science.* 329(5988):142. 2010.
- DEJNIRATTISAI, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., et al. **Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus.** *Nat Immunol.* 7(9):1102-8. doi: 10.1038/ni.3515. 2016.
- DEJNIRATTISAI, W., Webb, A. I., Chan, V., et al. **Lectin switching during dengue virus infection.** *J. Infect. Dis.* 203:1775–83. 2011.
- DEL CAMPO, M., Feitosa, I. M., Ribeiro, E. M., et al. **The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome.** *Am J Med Genet A.* 173(4):841-857. doi: 10.1002/ajmg.a.38170. 2017.
- DELGADO, F. G., Torres, K. I., Castellanos, J. E., et al. **Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans.** *Viruses.* 10(9). pii: E480. doi: 10.3390/v10090480. 2018.
- DENG, S. Q., Yang, X., Wei, Y. **A Review on Dengue Vaccine Development.** *Vaccines (Basel).* 8(1). pii: E63. doi: 10.3390/vaccines8010063. 2020.
- DENIS, J., Attoumani, S., Gravier, P., et al. **High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel.** *PLoS Negl Trop Dis.* 13(9):e0007747. Published 2019 Sep 20. doi:10.1371/journal.pntd.0007747. 2019.
- DE-OLIVEIRA-PINTO, L. M., Marinho, C. F., Povoia, T. F., et al. **Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever.** *PLoS One.* 7(7):e38527. doi:10.1371/journal.pone.0038527. 2012.
- DEUBEL, V., Laille, M., Hugnot, J. P., et al. **Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood.** *J Virol Methods.* 30:41–54. 1990.
- DHANDA, S. K., Vita, R, Há, B., et al. **ImmuneBrowser: a tool to aggregate and visualize complex and heterogeneous epitopes in reference protein.** *Bioinformatics.* 34(22):3931-3933. doi: 10.1093/bioinformatics/bty463. 2018.
- DIAMOND, M. S., Roberts, T. G., Edgil, D., et al. **Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons.** *J Virol.* 74(11):4957-66. 2000.
- DICK, G. W., Kitchen, S. F, Haddow, A. J. **Zika virus. I. Isolations and serological specificity.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Sep;46(5):509-20. 1952.
- DO ROSÁRIO, M. S., de Jesus, P. A., Vasilakis, N., et al. **Guillain-Barré Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil.** *Am J Trop Med Hyg.* 95(5):1157-1160. Epub 2016 Sep 19. 2016.
- DONALD, C. L., Brennan, B., Cumberworth, S. L., et al. **Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil.** *PLoS Negl. Trop.Dis.* 10:e0005048. 2016.
- DOWD, K. A., De Maso, C. R., Pelc, R. S., et al. **Broadly neutralizing activity of Zika virus-immune sera identifies a single viral serotype.** *Cell Rep.* 16:1485–91. 2016.
- DOWD, K. A., Ko, S. Y., Morabito, K. M., et al. **Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus.** *Science.* 354:237–240. 2016.

- DUANGCHINDA, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., et al. **Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(39):16922-7. doi: 10.1073/pnas.1010867107. 2010.
- DUFFY, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., et al. **Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.** *N Engl J Med*. 360(24):2536-43. doi: 10.1056/NEJMoa0805715. 2009.
- DUNG, N. T., Duyen, H. T., Thuy, N. T., et al. **Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue.** *J Immunol*. 184(12):7281-7. doi: 10.4049/jimmunol.0903262. 2010.
- DURBIN, A. P., Vargas, M. J., Wanionek, K., et al. **Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever.** *Virology*. 376:429–35. 2008.
- EDUPUGANTI, S., Natrajan, M. S., Roupael, N., et al. **Biphasic Zika Illness With Rash and Joint Pain.** *Open Forum Infect Dis*. 4(3):ofx133. doi: 10.1093/ofid/ofx133. 2017.
- EL SAHLY, H. M., Gorchakov, R., Lai, L., et al. **Clinical, Virologic, and Immunologic Characteristics of Zika Virus Infection in a Cohort of US Patients: Prolonged RNA Detection in Whole Blood.** *Open Forum Infect Dis*. 6(1):ofy352. doi: 10.1093/ofid/ofy352. 2018.
- ESTOFOLETE, C. F., Terzian, A. C. B., Colombo, T. E., et al. **Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil.** *J Infect Public Health*. 12(2):178-181. doi: 10.1016/j.jiph.2018.09.007. 2019.
- FAGBAMI, A. H. **Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State.** *J Hyg (Lond)*. 83(2):213-9. 1979.
- FAGBAMI, A. H., Monath, T. P., Fabiyi, A. **Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 71(1):60-5. 1977.
- FALCÓN-LEZAMA, J. A., Ramos, C., Zuñiga, J., et al. **HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever.** *Acta Trop*. 112(2):193-197. doi:10.1016/j.actatropica.2009.07.025. 2009.
- FERNANDEZ, E e DIAMOND, M. S. **Vaccination strategies against Zika virus.** *Curr Opin Virol*. 23:59-67. doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.006. 2017. Review.
- FERNANDEZ, E., Dejnirattisai, W., Cao, B., et al. **Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection.** *Nat Immunol*. 18(11):1261-1269. doi:10.1038/ni.3849. 2017.
- FLAMAND, M., Megret, F., Mathieu, M., et al. **Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion.** *J Virol*. 73(7):6104-10. 1999.
- FOY, B. D., Kobylinski, K. C., Chilson Foy, J. L., et al. **Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA.** *Emerg Infect Dis*. 17(5):880-2. doi: 10.3201/eid1705.101939. 2011.
- FRANÇA, G. V. A., Pedi, V. D., Garcia, M. H. O., et al. **Congenital syndrome associated with Zika virus infection among live births in Brazil: a description of the distribution of reported and confirmed cases in 2015-2016.** *Epidemiol Serv Saude*. 27(2):e2017473. doi: 10.5123/S1679-49742018000200014. 2018.
- FREIRE, M. C. L. C., Pol-Fachin, L., Coêlho, DF, et al. **Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses.** *ACS Omega*. 2(7):3913-3920. doi:10.1021/acsomega.7b00608. 2017.
- FRIBERG, H., Burns, L., Woda, M., Kalayanarooj, S., et al. **Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive.** *Immunol Cell Biol*. 89(1):122-9. doi: 10.1038/icb.2010.61. 2011.
- FRIBERG, H., Bashyam, H., Toyosaki-Maeda, T., et al. **Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans.** *Sci Rep*. 1:51. doi: 10.1038/srep00051. 2011b.
- FRIBERG, H., Jaiswal, S., West, K., et al. **Analysis of human monoclonal antibodies generated by dengue virus-specific memory B cells.** *Viral Immunol*. 25(5):348-59. doi: 10.1089/vim.2012.0010. 2012.
- FRIED, JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, et al. **Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006.** *PLoS Negl Trop Dis*. 4(3):e617. Published 2010 Mar 2. doi:10.1371/journal.pntd.0000617. 2010.
- FRY, TJ, Connick E, Falloon J, et al. **A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis.** *Blood*. 97(10):2983-2990. doi:10.1182/blood.v97.10.2983. 2001.
- FRY, TJ, Mackall CL. **The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance.** *J Immunol*. 174(11):6571-6576. doi:10.4049/jimmunol.174.11.6571. 2005.

- FULLER, MJ, Hildeman DA, Sabbaj S, et al. **Cutting edge: emergence of CD127high functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help.** *J Immunol.* 174(10):5926-5930. doi:10.4049/jimmunol.174.10.5926. 2005.
- GACK, M. U. e DIAMOND, M. S. **Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses.** *Curr. Opin. Virol.* 20:119–2. 2016.
- GACK, MU, DIAMOND MS. **Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses.** *Curr Opin Virol.* 20:119-128. doi:10.1016/j.coviro.2016.09.013. 2016.
- GARCIA, M., Wehbe, M., Lévêque, N., et al. **Skin innate immune response to flaviviral infection.** *Eur Cytokine Netw.* 28(2):41-51. doi: 10.1684/ecn.2017.0394. 2017.
- GARCÍA-BUJALANCE, S., Gutiérrez-Arroyo, A., De la Calle, F., et al. **Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: Report of 5 cases.** *J Clin Virol.* 96:110-115. doi: 10.1016/j.jcv.2017.10.006. 2017.
- GARDNER, L. M., Bóta, A., Gangavarapu, K., et al. **Inferring the risk factors behind the geographical spread and transmission of Zika in the Americas.** *PLoS Negl Trop Dis.* 12(1):e0006194. doi: 10.1371/journal.pntd.0006194. 2018.
- GARG, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., Joshi, A. **Recent Advances in Zika Virus Vaccines.** *Viruses.* 10(11). pii: E631. doi: 10.3390/v10110631. Review. 2018.
- GESER, A., Henderson, B. E., Christensen, S. **A multipurpose serological survey in Kenya. 2. Results of arbovirus serological tests.** *Bull World Health Organ.* 43(4):539-52. 1970.
- GONÇALVES, A., Peeling, R. W., Chu, M. C. et al. **Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report.** *J Infect Dis.* 217(7):1060-1068. doi: 10.1093/infdis/jix678. 2018.
- GOURINAT, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., et al. **Detection of Zika virus in urine.** *Emerg Infect Dis.* 21(1):84-6. 2015.
- GRANGER, D., Hilgart, H., Misner, L., et al. **Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences.** *J Clin Microbiol.* 55(7):2127-2136. doi: 10.1128/JCM.00580-17. 2017.
- GRANT, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., et al. **Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling.** *Cell Host Microbe.* 19(6):882-90. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009. 2016.
- GREENBAUM, J, Sidney J, Chung J, et al. **Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes.** *Immunogenetics.* 63(6):325-335. doi:10.1007/s00251-011-0513-0. 2011.
- GRIFONI, A., Costa-Ramos, P., Pham, J., et al. **Cutting Edge: Transcriptional Profiling Reveals Multifunctional and Cytotoxic Antiviral Responses of Zika Virus-Specific CD8+ T Cells.** *J Immunol.* 201(12):3487-3491. doi: 10.4049/jimmunol.1801090. 2018.
- GRIFONI, A., Pham, J., Sidney, J., et al. **Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans.** *J Virol.* 91(24). pii: e01469-17. doi: 10.1128/JVI.01469-17. 2017.
- GUBLER, D. J. **Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st Century.** *Trop Med Health.* 39: 1–9. 2011.
- GUBLER, D. J., Vasilakis, N. e Musso, D. **History and Emergence of Zika Virus.** *J Infect Dis.* Dec 16;216(suppl_10):S860-S867. 2017.
- GUIRAKHOO, F., Kitchener, S., Morrison, D. et al. **Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes.** *Hum Vaccin.* 2(2):60-7. 2006.
- GUY, B., Nougarede, N., Begue, S., et al. **Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects.** *Vaccine.* 26(45):5712-21. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.019. 2008.
- GUZMÁN, M. G., Kouri, G., Valdes, L., et al. **Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks.** *Rev Panam Salud Publica.* 11(4):223-7. 2002.
- GUZMÁN, M. G., Kouri, G., Valdes, L., et al. **Epidemiologic studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997.** *Am J Epidemiol.* 152(9):793-9; discussion 804. 2000.
- HADINEGORO, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., et al. **Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease.** *N Engl J Med.* 373(13):1195-206. doi: 10.1056/NEJMoa1506223. 2015.
- HALAI, UA, Nielsen-Saines K, Moreira ML, et al. **Maternal Zika Virus Disease Severity, Virus Load, Prior Dengue Antibodies, and Their Relationship to Birth Outcomes.** *Clin Infect Dis.* 65(6):877-883. doi:10.1093/cid/cix472. 2017.
- HALSTEAD SB. **Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses.** *Adv Virus Res.* 60:421-67. 2003. Review.

- HALSTEAD, S. B. **Dengue**. *Lancet*. 370:1644–52, 164. 2007.
- HALSTEAD, S. B. e O'ROURKE, E. J. **Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes**. *Nature*. 265(5596):739-41. 1977.
- HARENBERG, A., Begue, S., Mamessier, A., et al. **Persistence of Th1/Tc1 responses one year after tetravalent dengue vaccination in adults and adolescents in Singapore**. *Hum Vaccin Immunother*. 9(11):2317-25. 2013.
- HASTINGS, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., et al. **TAM receptors are not required for Zika virus infection in mice**. *Cell Rep*. 19:558–68. 2017.
- HATCH, S., Endy, T. P., Thomas, S., et al. **Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection**. *J Infect Dis*. 203(9):1282-91. doi: 10.1093/infdis/jir012. 2011.
- HERRERA, B. B., Tsai, W. Y., Brites, C., et al. **T Cell Responses to Nonstructural Protein 3 Distinguish Infections by Dengue and Zika Viruses**. *mBio*. 9(4). pii: e00755-18. doi: 10.1128/mBio.00755-18. Erratum in: *MBio*. 2018 Oct 23;9(5). 2018
- HO, L. J., Wang, J. J., Shaio, M. F., et al. **Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production**. *J Immunol*. 166(3):1499-506. 2001.
- HOLMAN, D. H., Wang, D., Raviprakash, K., et al. **Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes**. *Clin. Vaccine Immunol*. 14, 182. 2007.
- HOTTA, S. **Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus**. *J Infect Dis*. 90:1–9. 1952.
- HOU, W., Armstrong, N., Obwolo, L. A., et al. **Determination of the Cell Permissiveness Spectrum, Mode of RNA Replication, and RNA-Protein Interaction of Zika Virus**. *BMC Infect Dis*. 17(1):239. doi: 10.1186/s12879-017-2338-4. 2017.
- HSIEH, MF, Lai SL, Chen JP, et al. **Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus**. *J Immunol*. 177(3):1855-1863. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1855. 2006.
- HUANG, C. Y., Butrapet, S., Pierro, D. J., et al. **Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine**. *J Virol*. 74(7):3020-8. 2000.
- HUANG, C. Y., Butrapet, S., Tsuchiya, K. R., et al. **Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development**. *J Virol*. 77(21):11436-47. 2003.
- HUANG, H, Li S, Zhang Y, et al. **CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection**. *J Virol*. 91(22):e00900-17. Published 2017 Oct 27. doi:10.1128/JVI.00900-17. 2017.
- HUZLY, D., Hanselmann, I., Schmidt-Chanasit, J., et al. **High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses**. *Euro Surveill*. 21(16). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30203. 2016.
- IOOS, S., Mallet, H. P., Leparac Goffart, I., et al. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics**. *Med Mal Infect*. 44(7):302-7. doi: 10.1016/j.medmal.2014.04.008. 2014.
- JESSIE, K, Fong, M. Y., Devi, S., et al. **Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization**. *J. Infect. Dis*. 189:1411–18. 2004.
- JUNJHON, J., Lausumpao, M., Supasa, S., et al. **Differential modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution, and virus infectivity by conserved residues at nonfurin consensus positions of the dengue virus pr-M junction**. *J. Virol*. 82:10776–91. 2008.
- JURADO, KA, Yockey LJ, Wong PW, et al. **Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice**. *Nat Microbiol*. 3:141-7. 2018.
- KADKHODA, K., Gretchen, A., Racano, A. **Evaluation of a commercially available Zika virus IgM ELISA: specificity in focus**. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 88(3):233-235. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.002. 2017.
- KAECH, SM, Tan JT, Wherry EJ, et al. **Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells**. *Nat Immunol*. 4:1191-8. 2003.
- KAM, YW, Leite JA, Amrun SN, et al. **ZIKV-Specific NS1 Epitopes as Serological Markers of Acute Zika Virus Infection**. *J Infect Dis*. 220(2):203-212. doi:10.1093/infdis/jiz092. 2019.
- KATZELNICK, L. C e HARRIS, E. **Immune correlates of protection for dengue: State of the art and research agenda**. *Vaccine*. 35(36):4659-4669. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.07.045. 2017.
- KINDHAUSER, M. K., Allen, T., Frank, V., et al. **Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus**. *Bull World Health Organ*. 94(9):675-686C. 2016.
- KINNEY, R. M., Butrapet, S., Chang, G. J., et al. **Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53**. *Virology*. 230(2):300-8. 1997.

- KIRKPATRICK, B. D., Durbin, A. P, Pierce, K. K., et al. **Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults.** *Infect Dis.* 212(5):702-10. doi: 10.1093/infdis/jiv082. 2015.
- KLIKS, S. C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., et al. **Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants.** *Am J Trop Med Hyg.* 38: 411–19. 1988.
- KLIKS, S. C., Nisalak, A., Brandt, W. E., et al. **Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever.** *Am J Trop Med Hyg.* 40(4):444-51. 1989.
- KOBLISCHKE, M., Stiasny, K., Aberle, S. W., et al. **Structural Influence on the Dominance of Virus-Specific CD4 T Cell Epitopes in Zika Virus Infection.** *Front Immunol.* 9:1196. doi: 10.3389/fimmu.2018.01196. Erratum in: *Front Immunol.* 2018 Sep 11;9:2083. 2018.
- KOCHEL, T. J., Raviprakash, K., Hayes, C. G., et al. **A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys.** *Vaccine.* 18, 3166–3173. 2000.
- KRAEMER, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., et al. **The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*.** *eLife.* 4: e08347. doi: 10.7554/eLife.08347. 2015.
- KUDCHODKAR, S. B., Choi, H., Reuschel, E. L., et al. **Rapid response to an emerging infectious disease - Lessons learned from development of a synthetic DNA vaccine targeting Zika virus.** *Microbes Infect.* 220(11-12):676-684. doi: 10.1016/j.micinf.2018.03.001. 2018.
- LAI, L., Roupael, N., Xu, Y. **Innate, T-, and B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients.** *Clin Infect Dis.* Jan 6;66(1):1-10. doi: 10.1093/cid/cix732. 2018.
- LAM, P. K., Tam, D. T., Diet, T. V., et al. **Clinical characteristics of Dengue shock syndrome in Vietnamese children: a 10-year prospective study in a single hospital.** *Clin Infect Dis.* 57(11):1577-86. doi: 10.1093/cid/cit594. 2013.
- LANCIOTTI, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., et al. **Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol;* 30:545–51.1992.
- LANCIOTTI, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** *Emerg Infect Dis.*;14(8):1232-9. 2008.
- LANDRY, M. L. e ST GEORGE, K. **Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection.** *Arch Pathol Lab Med.* 141(1):60-67. doi: 10.5858/arpa.2016-0406-SA. Epub 2016 Oct 20. 2017.
- LAROCCA, RA, Abbink P, Peron JP, Zanotto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, et al. **Vaccine protection against Zika virus from Brazil.** *Nature.* 536:474-8. 2016.
- LAZO, L., Izquierdo, A., Suzarte, E., et al. **Evaluation in mice of the immunogenicity and protective efficacy of a tetravalent subunit vaccine candidate against dengue virus.** *Microbiol. Immunol.* 58, 219–226. 2014.
- LEAL, Aline. **Brasil vive triplíce epidemia de vírus transmitidos pelo *Aedes aegypti*.** *Agência Brasil,* 2016. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-04/brasil-vive-triplice-epidemia-de-virus-transmitidos-pelo-aedes-aegypti>. Acesso em: 25 de Maio de 2020.
- LEE, H. C., Butler, M., Wu, S.C. **Using recombinant DNA technology for the development of live-attenuated dengue vaccines.** *Enzyme Microb Technol.* 51(2):67-72. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.05.005. Review. 2002.
- LEE, HJ, Cho Y, Kang HJ, et al. **Identification of peptide based B-cell epitopes in Zika virus NS1.** *Biochem Biophys Res Commun.* 505(4):1010-1014. doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.024. 2018.
- LEO, Y. S., Wilder-Smith, A., Archuleta, S., et al. **Immunogenicity and safety of recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in individuals aged 2–45 y: phase II randomized controlled trial in Singapore.** *Hum Vaccin Immunother.* 8(9):1259-71. doi: 10.4161/hv.21224. 2012.
- L'HUILLIER, A. G., Hamid-Allie, A., Kristjanson, E., et al. **Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing.** *J Clin Microbiol.* 55(8):2462-2471. doi: 10.1128/JCM.00442-17. 2017.
- LIBRATY, D. H., Pichyangkul, S., Ajariyakhajorn, C., et al. **A. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis.** *J Virol.* 75(8):3501-8. 2001.
- LIBRATY, D. H., Young, P. R., Pickering, D, et al. **High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever.** *J Infect Dis.* 186(8):1165-8. 2002.
- LIM, M. Q., Kumaran, E. A. P, Tan, H. C., et al. **Cross-Reactivity and Anti-viral Function of Dengue Capsid and NS3-Specific Memory T Cells Toward Zika Virus.** *Front Immunol.* 9:2225. doi: 10.3389/fimmu.2018.02225. 2018.

- LIN, H. H., Yip, B. S., Huang, L. M., et al. **Zika virus structural biology and progress in vaccine development.** *Biotechnol Adv.* 36(1):47-53. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.004. 2018.
- LINDOW, JC, Borochoff-Porte N, Durbin AP, et al. **Primary vaccination with low dose live dengue 1 virus generates a proinflammatory, multifunctional T cell response in humans.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(7):e1742. doi:10.1371/journal.pntd.0001742. 2012.
- LIU, W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.** *J Exp Med.* 203(7):1701-1711. doi:10.1084/jem.20060772. 2006.
- LOKE, H, Bethell DB, Phuong CX, et al. **Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword?** *J Infect Dis.* 184(11):1369-1373. doi:10.1086/324320. 2001.
- LUSTIG, Y., Zelena, H., Venturi, G., et al. **Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile.** *J Clin Microbiol.* 55(6):1894-1901. doi: 10.1128/JCM.00346-17. Epub 2017 Apr 5. 2017.
- MA, A, Koka R, Burkett P. **Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis.** *Annu Rev Immunol.* 24:657-679. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090727. 2006.
- MACKENZIE, J. M., Jones, M. K. e Young, P. R. **Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication.** *Virology.* 220(1):232-40. 1996.
- MALAVIGE, G. N., de Alwis, N. M., Weerasooriya, N., et al. **Increasing diabetes and vascular risk factors in a sub-urban Sri Lankan population.** *Diabetes Res Clin Pract.* 57(2):143-5. 2002.
- MALAVIGE, GN, Rostron T, Rohanachandra LT, et al. **HLA class I and class II associations in dengue viral infections in a Sri Lankan population.** *PLoS One.* 6(6):e20581. doi:10.1371/journal.pone.0020581. 2011.
- MANANGEESWARAN, M, Ireland DD, Verthelyi D. **Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice.** *PLoS Pathog.* 12(11):e1006004. Published 2016 Nov 17. doi:10.1371/journal.ppat.1006004. 2016.
- MANGADA, M. M., Endy, T. P., Nisalak, A., et al. **Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren.** *J Infect Dis.* 185(12):1697-703. 2002.
- MANOKARAN, G., Finol, E., Wang, C., et al. **Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness.** *Science.* 350:217-21. 2015.
- MANSUY, J. M., Dutertre, M., Mengelle, C. et al. **Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen?** *Lancet Infect Dis.* 16(4):405. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00138-9. 2016.
- MANSUY, J. M., Mengelle, C., Pasquier, C., et al. **Zika Virus Infection and Prolonged Viremia in Whole-Blood Specimens.** *Emerg Infect Dis.* 23(5):863-865. doi: 10.3201/eid2305.161631. 2017.
- MANSUY, J. M., Pasquier, C., Daudin, M., et al. **Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area.** *Lancet Infect Dis.* 16(8):894-5. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30153-0. 2016.
- MARSH, Steven GE. **HLA Alleles Numbers.** *HLAalleles.org*, 2020. Disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. Acesso em: 28 de junho de 2020.
- MARTINES, R. B., Bhatnagar, J., Keating, M. K., et al. **Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65(6):159-60. doi: 10.15585/mmwr.mm6506e1. 2016.
- MEDINA, F. A., Torres, G., Acevedo, J., et al. **Duration of the Presence of Infectious Zika Virus in Semen and Serum.** *J Infect Dis.* 219(1):31-40. doi: 10.1093/infdis/jiy462. 2019.
- MEERTENS, L., Carnec, X., Lecoin, M. P., et al. **The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry.** *Cell Host Microbe.* 12:544-57. 2012.
- MERCADO-REYES, M, Acosta-Reyes J, Navarro-Lechuga E, et al. **Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia.** *Epidemiol Infect.* 147:e77. doi:10.1017/S095026881800359X. 2019.
- MIAGOSTOVICH, MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V. **Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis.** *J Clin Virol.* 14:183-9. 1999.
- MILLER, J. L., de Wet, B. J., Martinez-Pomares, L., et al. **The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages.** *PLOS Pathog.* 4:e17. 2008.
- MINER, J. J. e DIAMOND, M. S. **Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism.** *Cell Host Microbe.* 21(2):134-142. doi: 10.1016/j.chom.2017.01.004. 2017. Review. 2017.
- MINER, J. J., Sene, A., Richner, J. M., et al. **Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears.** *Cell Rep.* 16(12):3208-3218. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.079. 2016.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. MS (2015). Ministry of Health of Brazil. The Ministry of Health announces epidemiological bulletin. Available at: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20805>. Accessed January 28, 2016
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde: Informe epidemiológico da dengue análise de situação e tendências. 2010. Available from: <http://portalsms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>; Ministério da Saúde. Combate à dengue, histórico. 2010. Available from: <http://combateaedes.saude.gov.br/pt/historico>
- MLAKAR, J., Korva, M., Tul, N., et al. **Zika Virus Associated with Microcephaly**. *N Engl J Med*. 374(10):951-8. doi: 10.1056/NEJMoa1600651. 2016.
- MODIS, Y., Ogata, S., Clements, D., et al. **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion**. *Nature*. 427:313–19. 2004.
- MODIS, Y., Ogata, S., Clements, D., et al. **Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein**. *J. Virol*. 79:1223–31. 2005.
- MONGKOLSAPAYA, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N et al. **Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever**. *Nat Med*. 9(7):921-7. 2003.
- MONTOYA, M., Gresh, L., Mercado, J., et al. **Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year**. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(8):e2357. 2013
- MONTOYA, M., Schiavoni, G., Mattei, F., et al. **Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation**. *Blood*. 99(9):3263-71. 2002.
- MOORE, C. A., Staples, J. E., Dobyns, W. B., et al. **Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians**. *JAMA Pediatr*. 171(3):288-295. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.3982. 2017. Review.
- MOR, G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. **Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site**. *Ann N Y Acad Sci*. 1221(1):80-87. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x. 2011.
- MOR, G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 63(6):425-433. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x. 2010.
- MORA-CÁRDENAS, E, Aloise C, Faoro V, et al. **Comparative specificity and sensitivity of NS1-based serological assays for the detection of flavivirus immune response**. *PLoS Negl Trop Dis*. 14(1):e0008039. Published 2020 Jan 29. doi:10.1371/journal.pntd.0008039. 2020.
- MORENO, GK, Newman CM, Koenig MR, Mohns MS, Weiler AM, Rybarczyk S, et al. **Long-term protection of rhesus macaques from Zika virus reinfection**. *J Virol*. pii: JVI.01881-19. 2019.
- MORRISON J. e GARCÍA-SASTRE, A. **STAT2 signaling and dengue virus infection**. *JAKSTAT*. 3(1):e27715. doi: 10.4161/jkst.27715. 2014. Review.
- MOTTA, I. J., Spencer, B. R., Cordeiro da Silva, S. G., et al. **Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion**. *N Engl J Med*. 375(11):1101-3. doi: 10.1056/NEJMc1607262. 2016.
- MULLER, D. A. e YOUNG, P. R. **The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker**. *Antiviral Res*. 98(2):192-208. 2013.
- MULLER, D. A., Depelsenaire, A. C, Young, P. R. **Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection**. *J Infect Dis*. 215(suppl_2):S89-S95. doi: 10.1093/infdis/jiw649. 2017.
- MUÑOZ-JORDAN, J. L., Sánchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M., et al. **Inhibition of interferon signaling by dengue virus**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(24):14333-8. 2003.
- MUSSO, D. e GUBLER, D. J. **Zika Virus**. *Clin Microbiol Rev*. Jul;29(3):487-524. doi: 10.1128/CMR.00072-15. 2016. Review.
- MUSSO, D. **Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil**. *Emerg Infect Dis*. 21:1887. 2015.
- MUSSO, D., Bossin, H., Mallet, H. P. et al. **Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak**. *Lancet Infect Dis*. May;18(5):e172-e182. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30446-2. 2018.
- MUSSO, D., Roche, C., Robin, E., et al. **Potential sexual transmission of Zika virus**. *Emerg Infect Dis*. 21(2):359-61. doi: 10.3201/eid2102.141363. Erratum in: *Emerg Infect Dis*. 2015 Mar;21(3):552. 2015.
- NAJIOULLAH, F., Viron, F., Césaire, R. **Evaluation of four commercial real-time RT-PCR kits for the detection of dengue viruses in clinical samples**. *Virology*. 11:164. 2014.
- NASIRUDEEN, A. M., Wong, H. H., Thien, P., et al. **RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection**. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(1):e926. doi: 10.1371/journal.pntd.0000926. 2011.

- NAVARRO-SANCHEZ, E., Altmeyer, R., Amara, A., et al. **Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses.** *EMBO Rep.* 4:1–6. 2003.
- NGONO, A. E. e SHRESTA, S. **Immune Response to Dengue and Zika.** *Annu Rev Immunol.* 36:279-308. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053142. 2018. Review.
- NGUYEN, TP, Kikuchi M, Vu TQ, et al. **Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2(10):e304. Published 2008 Oct 1. doi:10.1371/journal.pntd.0000304. 2008.
- NORONHA, L., Zanluca, C., Azevedo, M. L., et al. 2016. **Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 111:287–93.
- OEHLER, E, Watrin, L, Larre. et al. **Zika virus infection complicated by Guillain--Barre syndrome-case report, French Polynesia, December 2013.** *Euro Surveill.* 19: pii: 20720. 2014.
- OSORIO, J. E., Huang CY, Kinney RM., et al. **Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever.** *Vaccine.* 29(42):7251-60. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.020. 2011. Review.
- PAIARDINI, M, Cervasi B, Albrecht H, et al. **Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in HIV-infected individuals.** *J Immunol.* 174(5):2900-2909. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2900. 2005.
- PAIXAO, E. S., Costa, M., Teixeira, M. G., et al. **Symptomatic dengue infection during pregnancy and the risk of stillbirth in Brazil, 2006–12: a matched case-control study.** *Lancet Infect Dis.*; 17:957–64. 2017.
- PALMEIRA, P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, et al. **IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies.** *Clin Dev Immunol.* 2012:985646. doi:10.1155/2012/985646. 2012.
- PANG, X., Zhang, R., Cheng, G. **Progress towards understanding the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever.** *Virol Sin.* 32(1):16-22. doi: 10.1007/s12250-016-3855-9. Review. 2017.
- PARDY, RD, Rajah MM, Condotta SA, et al. **Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice.** *PLoS Pathog.* 13(2):e1006184. Published 2017 Feb 23. doi:10.1371/journal.ppat.1006184. 2017.
- PARK, JH, Yu Q, Erman B, et al. **Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival.** *Immunity.* Premkumar L, Collins M, Graham S, et al. **Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection.** *J Clin Microbiol.* 56(3):e01504-17. Published 2018 Feb 22. doi:10.1128/JCM.01504-17. 2018.
- PARK, SJ, Pai KS, Kim JH, Shin JI. **The role of interleukin 6 in the pathogenesis of hyponatremia associated with Guillain-Barré syndrome.** *Nefrologia.* 32(1):114. doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jan.11115. 2012.
- PATIL, V. S., Madrigal, A., Schmiedel, B. J., et al. **Precursors of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes identified by single-cell transcriptome analysis.** *Sci Immunol.* 3(19). pii: ean8664. doi: 10.1126/sciimmunol.aan8664. 2018.
- PAZ-BAILEY, G., Rosenberg, E. S., Doyle, K., et al. **Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Final Report.** *N Engl J Med.* 379(13):1234-1243. doi: 10.1056/NEJMoa1613108. 2017.
- PEELING, R. W., Artsob, H., Pelegrino, J. L. et al. **Evaluation of diagnostic tests: dengue.** *Nat Rev Microbiol.* 8:S30–8. 2010.
- PIERSON, T. C. e GRAHAM, B. S. **Zika Virus: Immunity and Vaccine Development.** *Cell.* 167(3):625-631. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.020. Epub 2016 Sep 29. 2016.
- PRIYAMVADA, L., Cho, A., Onlamoon, N., et al. **B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts.** *J Virol.* 90(12):5574-85. doi: 10.1128/JVI.03203-15. 2016.
- PRIYAMVADA, L., Hudson, W., Ahmed, R., et al. **Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology.** *Emerg Microbes Infect.* 6(5):e33. doi: 10.1038/emi.2017.42. Review. 2017.
- PROMPETCHARA, E., Ketloy, C., Thomas, S. J., et al. **Dengue vaccine: Global development update.** *Asian Pac J Allergy Immunol.* doi: 10.12932/AP-100518-0309. 2019.
- PUTNAK, R., Cassidy, K., Conforti, N., et al. **Immunogenic and protective response in mice immunized with a purified, inactivated, Dengue-2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 504–510. 1996.
- PYKE, A. T., Daly, M. T., Cameron, J. N., et al. **Imported zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014.** *PLoS Curr.* pii: ecurrents.outbreaks.4635a54dbffa2156fb2fd76dc49f65e. doi: 10.1371/currents.outbreaks.4635a54dbffa2156fb2fd76dc49f65e. 2014.

- RAMOS, C., Sanchez, G., Pando, R. H., et al. **Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever.** *J. Neurovirol.* 4:465–68. 1998.
- RAVICHANDRAN, S, Hahn M, Belaunzarán-Zamudio PF, et al. **Differential human antibody repertoires following Zika infection and the implications for serodiagnostics and disease outcome.** *Nat Commun.* 10(1):1943. Published 2019 Apr 26. doi:10.1038/s41467-019-09914-3. 2019.
- RAVIPRAKASH, K., Wang, D., Ewing, D., et al. **A Tetravalent Dengue Vaccine Based on a Complex Adenovirus Vector Provides Significant Protection in Rhesus Monkeys against All Four Serotypes of Dengue Virus.** *J. Virol.* 82, 6927. 2008.
- REGLA-NAVA, J. A., Elong Ngono, A., Viramontes, K. M., et al. **Cross-reactive Dengue virus-specific CD8+ T cells protect against Zika virus during pregnancy.** *Nat Commun.* 9(1):3042. doi: 10.1038/s41467-018-05458-0. 2018.
- REUSKEN, C., Pas, S., GeurtsvanKessel, C., et al. **Longitudinal follow-up of Zika virus RNA in semen of a traveller returning from Barbados to the Netherlands with Zika virus disease, March 2016.** *Euro Surveill.* 21(23):30251. 2016.
- REYNOLDS, CJ, Watber P, Santos CNO, et al. **Strong CD4 T Cell Responses to Zika Virus Antigens in a Cohort of Dengue Virus Immune Mothers of Congenital Zika Virus Syndrome Infants.** *Front Immunol.* 11:185. Published 2020 Feb 18. doi:10.3389/fimmu.2020.00185. 2020.
- RICCIARDI, M. J., Magnani, D. M., Grifoni, A, et al. **Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL.** *PLoS Negl Trop Dis.* 11(12):e0006000. doi: 10.1371/journal.pntd.0006000. 2017.
- RIGAU-PEREZ, J. G., Clark, G. G., Gubler, D. J. et al. **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** *Lancet.* 352:971-977. 1998.
- RIVINO, L., Kumaran, E. A., Jovanovic, V., et al. **Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection.** *J Virol.* 87(5):2693-706. doi: 10.1128/JVI.02675-12. 2013.
- RIVINO, L., Kumaran, E. A., Thein, T. L., et al. **Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural dengue infection.** *Sci Transl Med.* 7(278):278ra35. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0526. 2015
- ROBBIANI, DF, Bozzacco L, Keeffe JR, et al. **Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico.** *Cell.* 2017;169(4):597-609.e11. doi:10.1016/j.cell.2017.04.024. 2017.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A., van der Schaar, H. M., da Silva Voorham, J. M., et al. **Immature dengue virus: a veiled pathogen?** *PLOS Pathog.* 6:e1000718. 2010.
- RODRIGUEZ-MORALES, A. J., Villamil-Gómez, W. E., Franco-Paredes, C. **The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas.** *Travel Med Infect Dis.* 14(3):177-9. doi: 10.1016/j.tmaid.2016.05.004. 2016.
- ROSENBERGER, K. D., Lum, L., Alexander, N., et al. **Vascular leakage in dengue--clinical spectrum and influence of parenteral fluid therapy.** *Trop Med Int Health.* 21(3):445-53. doi: 10.1111/tmi.12666. 2016.
- ROTH, A., Mercier, A., Lepers, C., et al. **Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014.** *Euro Surveill.* 19(41). pii: 20929. 2014.
- ROTHMAN, A. L. **Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms.** *Nat Rev Immunol.* 11(8):532-43. 2011. Review.
- ROTHMAN, AL. **Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 338:83-98. doi:10.1007/978-3-642-02215-9_7. 2010.
- ROWE, E. K., Leo, Y. S., Wong, J. G., et al. **Challenges in dengue fever in the elderly: atypical presentation and risk of severe dengue and hospital-acquired infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* 8:e2777. 2014.
- RÜCKERT, C., Weger-Lucarelli, J., Garcia-Luna, S. M., et al. **Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes.** *Nat Commun.* 8:15412. doi: 10.1038/ncomms15412. 2017.
- RUDOLPH, KE, Lessler J, Moloney RM, et al. **Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review.** *Am J Trop Med Hyg.* 90(5):882-891. doi:10.4269/ajtmh.13-0403. 2014.
- RUSSELL, P. K. **The Zika pandemic-a perfect storm?** *PLoS Negl Trop Dis.* Mar 18;10(3):e0004589. doi: 10.1371/journal.pntd.0004589. 2016.
- SABIN, A. B. **Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever.** *Am J Trop Med Hyg.* 4:198-207. 1955.
- SABIN, A. B. **Research on dengue during World War II.** *Am J Trop Med Hyg.* 1:30-50. 1952.
- SALLES, T. S, da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E. S. L, et al. **History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review.** *Parasit Vectors.* Apr 24;11(1):264. doi: 10.1186/s13071-018-2830-8. 2018.

- SALLUSTO, F. **Heterogeneity of human CD4+ T cells against microbes.** *Annu Rev Immunol.* 34:317–34. 2016.
- SAPPARAPU, G, Fernandez E, Kose N, et al. **Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice.** *Nature.* 540(7633):443-447. doi:10.1038/nature20564. 2016.
- SCHAUB, B., Vouga, M., Najioullah, F., et al. **Analysis of blood from Zika virus-infected fetuses: a prospective case series.** *Lancet Infect Dis.* 17:520–7. 2017.
- SCHLUNS, KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. **Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo.** *Nat Immunol.* 1(5):426-432. doi:10.1038/80868. 2000.
- SCHNEIDER, WM, Chevillotte MD, Rice CM. **Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses.** *Annu Rev Immunol.* 32:513-545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231. 2014.
- SCREATON G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, et al. **New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection.** *Nat Rev Immunol.* 15(12):745-59. doi: 10.1038/nri3916. Review. 2015.
- SEDER, RA, Darrah PA, Roederer M. **T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design.** *Nat Rev Immunol.* 8(4):247-258. doi:10.1038/nri2274. 2008.
- SETTE A, SIDNEY J. **Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism.** *Immunogenetics.* 50(3-4):201-212. doi:10.1007/s002510050594. 1999.
- Shan, C., Ortiz, D. A., Yang, Y., et al. **Evaluation of a Novel Reporter Virus Neutralization Test for Serological Diagnosis of Zika and Dengue Virus Infection.** *J Clin Microbiol.* 55(10):3028-3036. doi: 10.1128/JCM.00975-17. 2017.
- SHAN, C., Xie, X., Shi, P., et al. **Zika virus vaccine: Progresses and challenges.** *Cell Host Microbe.* 24(1): 12–17. doi:10.1016/j.chom.2018.05.021. 2018.
- SIERRA, B, Alegre R, Pérez AB, et al. **HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection.** *Hum Immunol.* 68(6):531-540. doi:10.1016/j.humimm.2007.03.001. 2007.
- SILVA, JBC. **Frequência gênica dos alelos de HLA classe I e II e sua associação com a resposta imune celular T frente ao antígeno DENV-2 em pacientes infectados pelo vírus Dengue.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2015.
- SIMMONS, C. P., Chau, T. N., Thuy, T. T., et al. **Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants.** *J Infect Dis.* 196:416–24. 2007.
- SIMON-LORIERE, E., Faye, O., Prot, M., et al. **Autochthonous Japanese Encephalitis with Yellow Fever Coinfection in Africa.** *N Engl J Med.* 376(15):1483-1485. doi: 10.1056/NEJMc1701600. 2017.
- SIMPSON, D. I. **Zika Virus infection in man.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jul;58:335-8. 1964.
- SIU, R., Bukhari, W., Todd, A., et al. **Acute Zika infection with concurrent onset of Guillain-Barré Syndrome.** *Neurology.* 87(15):1623-1624. 2016.
- SIU, R., Bukhari, W., Todd, A., et al. **Acute Zika infection with concurrent onset of Guillain-Barré Syndrome.** *Neurology.* 87(15):1623-1624. 2016.
- SMITH, S. A., Zhou, Y., Olivarez, N. P., et al. **Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection.** *J Virol.* 86(5):2665-75. doi: 10.1128/JVI.06335-11. 2012.
- SONG, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., et al. **Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation.** *J Neuroimmunol.* 308:50-64. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.001. 2017. Review.
- SONG, H., Qi, J., Haywood, J. **Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses.** *Nat Struct Mol Biol.* 23(5):456-8. doi: 10.1038/nsmb.3213. 2016.
- SRIKIATKHACHORN, A., Rothman, A. L., Gibbons, R. V. et al. **Dengue--how best to classify it.** *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 53:563-567. 2011.
- STEINHAGEN, K., Probst, C., Radzinski, C., et al. **Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016.** *Euro Surveill.* 21(50). pii: 30426. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426. 2016.
- STEPHENS, HA, Klaythong R, Sirikong M, et al. **HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais.** *Tissue Antigens.* 60(4):309-318. doi:10.1034/j.1399-0039.2002.600405.x. 2002.
- STETTLER, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., et al. **Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection.** *Science.* 353(6301):823-6. doi: 10.1126/science.aaf8505. Epub 2016 Jul 14. 2016.
- SUBISSI, L., Dub, T., Besnard M, et al. **Zika Virus Infection during Pregnancy and Effects on Early Childhood Development, French Polynesia, 2013-2016.** *Emerg Infect Dis.* 24(10):1850-1858. doi: 10.3201/eid2410.172079. 2018.

- SUN, W, Nisalak A, Gettayacamin M, et al. **Protection of Rhesus monkeys against dengue virus challenge after tetravalent live attenuated dengue virus vaccination.** *J Infect Dis.* 193(12):1658-1665. doi:10.1086/503372. 2006.
- SUTHAR, M. S, Aguirre, S., Fernandez-Sesma, A. **Innate immune sensing of flaviviruses.** *PLoS Pathog.* 9(9):e1003541. doi: 10.1371/journal.ppat.1003541. 2013.
- SUY, A., Sulleiro, E., Rodó, C., et al. **Prolonged Zika virus viremia during pregnancy.** *N Engl J Med.* 375:2611–3. 2016.
- SVS/MS (2020). Boletim Epidemiológico 5. Acessado em 20 de Fevereiro de 2020. e <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/05/Boletim-epidemiologico-SVS-05.pdf>
- SWANSTROM, JA, Plante JA, Plante KS, et al. **Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus.** *mBio.* 7(4):e01123-16. Published 2016 Jul 19. doi:10.1128/mBio.01123-16. 2016.
- TAN, JT, Dudl E, LeRoy E, et al. **IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(15):8732-8737. doi:10.1073/pnas.161126098. 2001.
- TAN, M. H., Li, Q., Shanmugam, R., et al. **Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals.** *Nature.* 550(7675):249-254. doi: 10.1038/nature24041. 2017.
- TASSANEETRITHEP, B, Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., et al. **DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells.** *J. Exp. Med.* 197:823–29. 2003.
- TEBAS, P., Roberts, C. C., Muthumani, K., et al. **Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine - Preliminary Report.** *N Engl J Med.* doi: 10.1056/NEJMoa1708120. 2017.
- TELES, F. R., Prazeres, D. M., Lima-Filho, J. L. **Trends in dengue diagnosis.** *Rev Med Virol.* 15:287–302. 2005.
- THOMAS, S. J., Nisalak, A., Anderson, K. B., et al. **Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance.** *Am J Trop Med Hyg.* 81(5):825-33. doi: 10.4269/ajtmh.2009.08-0625. 2009.
- TIAN, Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, et al. **Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA.** *Nat Commun.* 8:1473-85. 2017.
- TIAN, Y., Babor, M., Lane, J. et al. **Dengue-specific CD8+ T cell subsets display specialized transcriptomic and TCR profiles.** *J Clin Invest.* 130:1727–41. doi: 10.1172/JCI12372. 2019b.
- TIAN, Y., Grifoni, A., Sette, A., et al. **Human T Cell Response to Dengue Virus Infection.** *Front Immunol.* 10:2125. doi: 10.3389/fimmu.2019.02125. 2019. Review.
- TIAN, Y., Seumois, G., De-Oliveira-Pinto, L. M., et al. **Molecular Signatures of Dengue Virus-Specific IL-10/IFN- γ Co-producing CD4 T Cells and Their Association with Dengue Disease.** *Cell Rep.* 29(13):4482-4495.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.098. 2019.
- TONNERRE, P, Melgaço JG, Torres-Cornejo A, et al. **Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection.** *Nat Microbiol.* 5(1):76-83. 2020.
- TOWNSLEY, E., Woda, M., Thomas, S. J., et al. **Distinct activation phenotype of a highly conserved novel HLA-B57-restricted epitope during dengue virus infection.** *Immunology.* 141(1):27-38. doi: 10.1111/imm.12161. 2014.
- TSAI, W. Y., Young, H. H., Brites, C., et al. **Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests.** *Clin Infect Dis.* 65(11):1829-1836. doi: 10.1093/cid/cix672. 2017.
- UNO, N. e ROSS, T. M. **Dengue virus and the host innate immune response.** *Emerg Microbes Infect.* 7(1):167. doi: 10.1038/s41426-018-0168-0. 2018.
- VALENTINE, KM, Rúbens Alves, Ying-Ting Wang and Sujana Shresta. **Memory CD8 T cell responses are impaired during Zika virus infection in mice.** *J Immunol.* 204 (1 Supplement) 94.4; 2020.
- VAN DER LINDEN, V, Filho EL, Lins OG, et al. **Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study.** *BMJ.* 354:i3899. doi: 10.1136/bmj.i3899. 2016.
- VAN LEEUWEN, EM, de Bree GJ, Remmerswaal EB, et al. **IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells.** *Blood.* 106(6):2091-2098. doi:10.1182/blood-2005-02-0449. 2005.
- VAN MEER, M. P. A, Mögling, R., Klaasse, J., et al. **Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence.** *J Clin Virol.* 92:25–31. 2017.
- VAUGHAN, K, Greenbaum J, Blythe M, Peters B, Sette A. **Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology.** *Viral Immunol.* 23(3):259-284. doi:10.1089/vim.2010.0006. 2010.
- VAUGHN, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., et al. **Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity.** *J Infect Dis.* 181(1):2-9. 2000.

- VENTURA, C. V., Maia, M., Bravo-Filho, V., et al. **Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly.** *Lancet.* 387: 228. 2016.
- VILLAR, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., et al. **Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America.** *N Engl J Med.* 372(2):113-23. doi: 10.1056/NEJMoa1411037. 2015.
- VOGELS, C. B. F., Rückert, C., Cavany, S. M., et al. **Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern?** *PLoS Biol.* 17(1):e3000130. doi: 10.1371/journal.pbio.3000130. 2019.
- WAGGONER, J. J., Gresh, L., Vargas, M. J., et al. **Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus.** *Clin Infect Dis.* 63(12):1584-1590. 2016.
- WAGGONER, J. J., Roupheal, N., Xu, Y., et al. **Pericarditis Associated With Acute Zika Virus Infection in a Returning Traveler.** *Open Forum Infect Dis.* 4(2):ofx103. doi: 10.1093/ofid/ofx103. 2017.
- WAHALA, W. M., Huang, C., Butrapet, S., et al. **Recombinant dengue type 2 viruses with altered e protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera.** *J Virol.* 86(7):4019-23. doi: 10.1128/JVI.06871-11. 2012.
- WAKIL, A. E., Wang, Z. E., Ryan, J. C., et al. **Interferon gamma derived from CD4+ T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development.** *J Exp Med.* 188(9):1651-6. 1998.
- WANG, J. P., Liu, P., Latz, E., et al. **Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition.** *J Immunol.* 177(10):7114-21. 2006.
- WEISKOPF, D., Angelo, M. A., de Azeredo, E. L., et al. **Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(22):E2046-53. doi: 10.1073/pnas.1305227110. 2013.
- WEISKOPF, D., Bangs, D. J., Sidney, J., et al. **Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(31):E4256-63. doi: 10.1073/pnas.1505956112. 2015.
- WELLS, M. F., Salick, M. R., Wiskow, O., et al. **Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection.** *Cell Stem Cell.* 19:703–8. 2016.
- WEN, J e SHRESTA, S. **Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: is it time to develop a universal vaccine?** *Curr Opin Immunol.* 59:1-8. doi: 10.1016/j.coi.2019.02.001. 2019. Review.
- WEN, J., Tang, W. W., Sheets, N., et al. **Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells.** *Nat Microbiol.* 2:17036. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.36. 2017.
- WHITE, L. J., Sariol, C. A., Mattocks, M. D., et al. **An alphavirus vector-based tetravalent dengue vaccine induces a rapid and protective immune response in macaques that differs qualitatively from immunity induced by live virus infection.** *J. Virol.* 87, 3409–3424. 2013.
- WHITEHEAD, S. S. **Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine?** *Expert Rev Vaccines.* 15(4):509-17. doi: 10.1586/14760584.2016.1115727. 2016.
- WHITEHEAD, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., et al. **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nat Rev Microbiol.* 5(7):518-28. 2007.
- WHO. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd edn.** Geneva: World Health Organization, 1997.
- WHO. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control.** New edition: 160. 2009.
- WICHMANN, O., Vannice, K., Asturias, E. J., et al. **Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness.** *Vaccine.* 35(42):5535-5542. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.066. 2017.
- WIJERATNE, D. T., Fernando, S., Gomes, L., et al. **Quantification of dengue virus specific T cell responses and correlation with viral load and clinical disease severity in acute dengue infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* 12(10):e0006540. doi: 10.1371/journal.pntd.0006540. 2018.
- WILDER-SMITH, A., Flasche, S. e Smith, P. G. **Vaccine-attributable severe dengue in the Philippines.** *Lancet.* 394(10215):2151-2152. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32525-5. 2019.
- WINKLER, G., Randolph, V. B., Cleaves, G. R., et al. **Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer.** *Virology.* 162(1):187-96. 1988.
- WONG, G, GAO GF. **An mRNA-based vaccine strategy against Zika.** *Cell Res.* 27(9):1077-1078. doi:10.1038/cr.2017.53. 2017.
- WU, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., et al. **Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection.** *Nat Med.* 6(7):816-20. 2000.
- XAVIER, D. R., Magalhães, M. A., Gracie, R., et al. **Spatial-temporal diffusion of dengue in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2013.** *Cad Saude Publica.* 33(2):e00186615. doi: 10.1590/0102-311X00186615. 2017.

- XU, M., Hadinoto, V., Appanna, R., et al. **Plasmablasts generated during repeated dengue infection are virus glycoprotein-specific and bind to multiple virus serotypes.** *J Immunol.* 189(12):5877-85. doi: 10.4049/jimmunol.1201688. 2012.
- XU, X., Vaughan, K., Weiskopf, D., et al. **Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species.** *PLoS Curr.* doi: 10.1371/currents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b. 2016.
- YOUNG, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., et al. **An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients.** *J Clin Microbiol.* 38:1053–7. 2000.
- YUNG, CF, Lee KS, Thein TL, et al. **Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, singapore.** *Am J Trop Med Hyg.* 92(5):999-1005. doi:10.4269/ajtmh.14-0628. 2015.
- ZANLUCA, C., Melo, V. C., Mosimann, A. L., et al. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(4):569-72. doi: 10.1590/0074-02760150192. 2015.
- ZEA-VERA, A. F. e PARRA, B. **Zika virus (ZIKV) infection related with immune thrombocytopenic purpura (ITP) exacerbation and antinuclear antibody positivity.** *Lupus.* 26(8):890-892. doi: 10.1177/0961203316671816. Epub 2016 Sep 30. 2017.
- ZHAO, Z, Tao M, Han W, et al. **Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response.** *J Gen Virol.* 10.1099/jgv.0.001376. doi:10.1099/jgv.0.001376. 2019.
- ZYBERT, I. A., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., et al. **Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions.** *J. Gen. Virol.* 89:3047–51. 2008.

10 ANEXOS

Anexo A – Artigos publicados em colaboração durante a tese

Artigo 1: Torrentes-Carvalho A, Hottz ED, Marinho CF, et al. Characterization of clinical and immunological features in patients coinfecting with dengue virus and HIV. *Clin Immunol.* 164:95-105. doi:10.1016/j.clim.2016.01.005. 2016.

Clinical Immunology 164 (2016) 95–105



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yylim



Characterization of clinical and immunological features in patients coinfecting with dengue virus and HIV



Amanda Torrentes-Carvalho^{a,*}, Eugênio Damaceno Hottz^b, Cintia Ferreira Marinho^a, Jéssica Badolatto-Corrêa da Silva^a, Luzia Maria de Oliveira Pinto^a, Luciana Gomes Fialho^a, Fernando Augusto Bozza^b, Rivaldo Venâncio Cunha^c, Paulo Vieira Damasco^d, Claire Fernandes Kubelka^a, Elzinandes Leal de Azeredo^{a,*}

^a Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^b Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Clínica Médica, FM, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

^d Hospital Universitário Gaffrêe Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNI RIO, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2015
Received in revised form 2 January 2016
accepted with revision 14 January 2016
Available online 28 January 2016

Keywords:

Coinfection
Lymphocytes
Cytokines
Dengue
HIV

ABSTRACT

The pathogenesis of dengue in subjects coinfecting with HIV remains largely unknown. We investigate clinical and immunological parameters in coinfecting DENV/HIV patients. According to the new dengue classification, most coinfecting DENV/HIV patients presented mild clinical manifestations of dengue infection. Herein, we show that DENV/HIV coinfecting patients had higher CD8 T cells percentages reflected as a lower CD4/CD8 ratio. Furthermore, CCR5 expression on CD4 T cells and CD107a expression on both T subsets were significantly higher in coinfecting patients when compared with mono-infected DENV and HIV individuals respectively. Increased inflammatory response was observed in treated HAART coinfecting patients despite undetectable HIV load. These data indicate that DENV infection may influence the clinical profile and immune response in individuals concomitantly infected with HIV.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In tropical countries, numerous infectious diseases coexist, and therefore the possibilities of coinfections are common. In this context, infections with human immunodeficiency virus [1] and dengue virus (DENV) are serious public health problems in tropical and subtropical regions and represent major public health problems in several countries,

including Brazil. DENV belongs to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, a small group of enveloped viruses [2] with a positive sense RNA virus that co-circulates in endemic regions as four closely-related distinct serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 [3]. In various regions of Brazil, dengue epidemics occur for decades, continually contributing to the high rates of morbidity and mortality [4]. In 2015 from January to July were reported 1,319,957 cases of dengue in the country with 1,092 severe cases and 600 deaths [5]. We have over 30 million people living with AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) caused by HIV. Since the 1980s, it was reported 757,000 cases of AIDS in Brazil, with detection ratio around 20.4 cases per 100,000 inhabitants representing 39,000 new AIDS cases per year. In the last years there was an increase in the number of people who started antiretroviral treatment with 57,000 in 2013 to 74,000 new treatments in 2014 [6].

HIV is a member of the genus *Lentivirus*, *Retroviridae* family and contains two single-stranded RNA copies of 9.2 kb comprising the HIV-1 and HIV-2 types. The natural history of HIV infection includes a long latency period, accompanied by the development of opportunistic infections and deregulation of lymphocyte T CD4 cells. At the time when the CD4 frequency is very low, the patient goes into a severe immunodeficiency and opportunistic infections, which can lead to the death in the absence of treatment [7]. Compared with HIV infection, the clinical course is quite different during dengue infection varying

Abbreviations: AIDS, Acquired Immunodeficiency Syndrome; Ag, antigen; ANOVA, analysis of variance; APC, antigen-presenting cell; APC-Cy7, Allophycocyanin conjugated cyanine dye; BSA, bovine serum albumin; CD, cluster of differentiation; Cy, cytochrome; DENV, dengue virus; DF, dengue fever; DHF/DSS, dengue hemorrhagic fever or shock syndrome; DMSO, dimethyl sulfoxide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leucocyte antigen; IFN, interferon; IL, interleukin; IP, induced protein; LPS, lipopolysaccharide; mAb, monoclonal antibody; MHC, major histocompatibility complex; NaN₃, sodium azide; NF- κ B, nuclear factor κ B; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PE-Cy7, phycoerythrin conjugated cyanine dye; RNA, ribonucleic acid; ROS, reactive oxygen species; TNF, tumor necrosis factor; RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction; WHO, World Health Organization.

* Corresponding authors at: Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Laboratório de Imunologia Viral, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Rio de Janeiro, RJ CEP 2104-360, Brazil.

E-mail addresses: biotorrentes@gmail.com (A. Torrentes-Carvalho), elzinandes@ioc.fiocruz.br (E.L. de Azeredo).

Artigo 2: Souza TM, Azeredo EL, Badolato-Corrêa J, et al. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS Curr. 9:ecurrents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727. 2017.

22/03/2020 First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil – PLOS Currents Outbreaks



First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil

February 14, 2017 · Research Article

Citation

Souza TMA, Azeredo EL, Badolato-Corrêa J, Damasco PV, Santos C, Petitinga-Paiva F, Nunes PCG, Barbosa LS, Cipitelli MC, Chouin-Carneiro T, Faria NRC, Nogueira RMR, de Bruycker-Nogueira F, dos Santos FB. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. PLOS Currents Outbreaks. 2017 Feb 14 . Edition 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727.

Revisions

This article is either a revised version or has previous revisions

Edition 1 - February 14, 2017 ▼

Authors

[Thiara Manuele Alves Souza](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Elzinandes Leal Azeredo](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Jessica Badolato-Corrêa](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Paulo Vieira Damasco](#)

Rio-Laranjeiras Hospital, Gaffrée Guinle University Hospital (Federal University of the State of Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, Brazil Pedro Ernesto University Hospital (University of the State of Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, Brazil.

[Carla Santos](#)

Rio-Laranjeiras Hospital, Rio de Janeiro, Brazil.

[Fabienne Petitinga-Paiva](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Priscila Conrado Guerra Nunes](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Luciana Santos Barbosa](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; UFRJ- Federal University of Rio de Janeiro, Laboratory of Genetics, IPPMG - Martagão Gesteira Child Care and Pediatrics Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Márcio Costa Cipitelli](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

<https://currents.plos.org/outbreaks/index.html%3Fp=71866.html>

1/14

Artigo 3: Azeredo EL, Dos Santos FB, Barbosa LS, et al. **Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil.** *PLoS Curr.* 10:ecurrents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5. 2018. doi:10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5.

5/2/2019 Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya ...



Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil

February 15, 2018 · Research Article

Citation

Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Nunes PCG, de-Oliveira-Pinto LM, de Filippis AM, Dal Fabbro M, Hoscher Romanholi I, Venancio da Cunha R. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLOS Currents Outbreaks*. 2018 Feb 15 . Edition 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5.

Authors

[Elzinandes Leal Azeredo](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Flavia Barreto dos Santos](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Luciana Santos Barbosa](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; UFRJ- Federal University of Rio de Janeiro, Laboratory of Genetics, IPPMG - Martagão Gesteira Child Care and Pediatrics Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Thiara Manuele Alves Souza](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Jessica Badolato-Corrêa](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Juan Camilo Sánchez-Arcila](#)

Laboratory of Viral Immunology, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

[Priscila Conrado Guerra Nunes](#)

Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Luzia Maria de-Oliveira-Pinto](#)

Fundação Oswaldo Cruz, Research, Immunology, Rio de Janeiro, Brasil.

[Ana Maria de Filippis](#)

Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

[Márcia Dal Fabbro](#)

Medical Clinic Department, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

[Izilyanne Hoscher Romanholi](#)

<http://currents.plos.org/outbreaks/index.html%3Fp=75762.html>

1/19

Artigo 4: de Souza TMA, Ribeiro ED, Corrêa VCE, et al. **Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016.** *Viruses*. 10(11):623. Published 2018 Nov 12. doi:10.3390/v10110623. 2018.



Article

Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016

Thiara Manuele Alves de Souza ¹, Edcelha D'Athaide Ribeiro ², Valmir Corrêa e Corrêa ³, Paulo Vieira Damasco ^{4,5,6}, Carla Cunha Santos ⁴, Fernanda de Bruycker-Nogueira ¹, Thaís Chouin-Carneiro ¹, Nieli Rodrigues da Costa Faria ¹, Priscila Conrado Guerra Nunes ¹ , Manoela Heringer ¹, Monique da Rocha Queiroz Lima ¹ , Jéssica Badolato-Corrêa ¹, Márcio da Costa Cipitelli ¹, Elzinandes Leal de Azeredo ¹, Rita Maria Ribeiro Nogueira ⁷ and Flavia Barreto dos Santos ^{1,*} 

¹ Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil; thiara.biomed@gmail.com (T.M.A.d.S.); nandanog@ioc.fiocruz.br (F.d.B.-N.); tatachouin@gmail.com (T.C.-C.); nielircf@ioc.fiocruz.br (N.R.d.C.F.); pricgn@ioc.fiocruz.br (P.C.G.N.); manolaheringer@yahoo.com.br (M.H.); moniqueq@ioc.fiocruz.br (M.d.R.Q.L.); jessica.badolato@ioc.fiocruz.br (J.B.-C.); marcio_cipitelli@ioc.fiocruz.br (M.d.C.C.); elzinandes@ioc.fiocruz.br (E.L.d.A.)

² Laboratório Central / Amapá (LACEN/AP), 68908-530 Macapá, Brazil; edcelhamanu@hotmail.com

³ Laboratório de Fronteira (LAFRON), Oiapoque, 69980-000 Amapá, Brazil; biomedicocorrae@gmail.com

⁴ Rio-Laranjeiras Hospital, 22240-000 Rio de Janeiro, Brazil; paulovieiradamasco@gmail.com (P.V.D.); ccih@fblo.com.br (C.C.S.)

⁵ Gaffrée Guinle University Hospital, Federal University of the State of Rio de Janeiro, 20270-003 Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Pedro Ernesto University Hospital, University of the State of Rio de Janeiro, 20551-030 Rio de Janeiro, Brazil

⁷ Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil; rita@ioc.fiocruz.br

* Correspondence: flaviab@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-25621755

Received: 28 September 2018; Accepted: 2 November 2018; Published: 12 November 2018



Abstract: Currently, Brazil lives a triple arboviruses epidemic (DENV, ZIKV and CHIKV) making the differential diagnosis difficult for health professionals. Here, we aimed to investigate chikungunya cases and the possible occurrence of co-infections during the epidemic in Amapá (AP) that started in 2014 when the first autochthonous cases were reported and in Rio de Janeiro (RJ) in 2016. We further performed molecular characterization and genotyping of representative strains. In AP, 51.4% of the suspected cases were confirmed for CHIKV, 71.0% (76/107). Of those, 24 co-infections by CHIKV/DENV, two by CHIKV/DENV-1, and two by CHIKV/DENV-4 were observed. In RJ, 76.9% of the suspected cases were confirmed for CHIKV and co-infections by CHIKV/DENV ($n = 8$) and by CHIKV/ZIKV ($n = 17$) were observed. Overall, fever, arthralgia, myalgia, prostration, edema, exanthema, conjunctival hyperemia, lower back pain, dizziness, nausea, retroorbital pain, and anorexia were the predominating chikungunya clinical symptoms described. All strains analyzed from AP belonged to the Asian genotype and no amino acid changes were observed. In RJ, the East-Central-South-African genotype (ECSA) circulation was demonstrated and no E1-A226V mutation was observed. Despite this, an E1-V156A substitution was characterized in two samples and for the first time, the E1-K211T mutation was reported in all samples analyzed.

Keywords: chikungunya virus; surveillance; co-infection; ECSA genotype; Asian genotype; Brazil



Review

Influence of chemokines on the endothelial permeability and cellular transmigration during dengue



Márcio da Costa Cipitelli, Iury Amâncio Paiva, Jéssica Badolato-Corrêa, Luzia Maria de-Oliveira-Pinto*

Laboratory of Viral Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Dengue
Endothelial cells
Chemokines

ABSTRACT

During a pathogenic infection, an inflammatory process is triggered in which several inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, growth factors, complement system components, nitric oxide, and others induce integrity alteration on the endothelial barrier. Chemokines are responsible for regulating leukocyte trafficking under homeostatic conditions as well as activating immune system cells under inflammatory conditions. They are crucial molecules in the early stages of infection, leading to the recruitment of immune cells, namely neutrophils, monocytes, natural killer (NK) cells, natural killer T cells (NKT), dendritic cells (DC), T lymphocytes and all cells expressing chemokine receptors for inflammatory sites. Other functions, such as collagen production, tissue repair, a proliferation of hematopoietic precursors and angiogenesis, are also performed by these molecules. Chemokines, amongst inflammatory mediators, play a key role in dengue immunopathogenesis. Dengue fever is a disease caused by the dengue virus (DENV). It is characterized by a broad spectrum of clinical manifestations ranging from asymptomatic cases to mild and severe symptomatic ones. As for the latter, the appearance of hemorrhagic manifestations and changes in vascular permeability may lead the patient to develop cavity effusions, organ involvement, and even death. As chemokines exert an influence on various homeostatic and inflammatory processes, acting vigorously on vascular endothelial activation and cell migration, the main purpose of this chapter is to discuss the influence of chemokines on the alteration of endothelial permeability and migration of T lymphocytes in DENV infection.

1. Immunopathogenesis of dengue: a brief review

1.1. Dengue virus

Dengue is considered a serious public health issue, stading within the 17 most neglected tropical diseases [1,2]. There is a hyper-endemicity of multiple dengue virus serotypes in many countries and the alarming impact both on human health and on global and national economies [3]. The World Health Organization (WHO) estimated a total of 390 million dengue infections per year, in which 96 million manifests clinically [4], with a 3.9 billion people prevalence, in 128 countries, at risk of infection [5]. According to the 2016 Global Burden of Disease Study, there was a significant increase in mortality from dengue between 2006 and 2016; from 20,800 deaths in 2006 to 37,800 deaths in 2016, whereas age-standardized rates increased from 0.3 deaths per 100,000 in 2006 to 0.5 deaths per 100,000 in 2016 [6]. Dengue epidemics have been expanding from tropical to subtropical regions in recent decades, partly fueled by urbanization and travel

[7–9]. Dengue is now endemic in regions of Africa, the Americas, Eastern Mediterranean, Southeastern Asia and the Western Pacific. The Americas, Southeastern Asia and Western Pacific are the most seriously affected [3].

Dengue is a vector-borne viral acute infection caused by the dengue virus (DENV). The virus belongs to the *Flaviviridae* family which comprises a wide diversity of arboviruses of great impact for the world health, such as Yellow Fever virus (YF), Saint Louis Encephalitis virus (SLEV), West Nile virus (WNV) and the Zika virus (ZIKV) [10,11]. Since the isolation of the first DENV serotype in 1943, four antigenically distinct serotypes (DENV-1–DENV-4) are known with approximately 67–75% structural homology between them [12,13]. It is widely accepted that an infection by any serotype offers immunity to disease due to that same serotype, but only short-term heterologous immunity to other serotypes. In addition, a secondary infection is more likely to take place with more severe symptoms than the primary infection. Nevertheless, how exactly the previous infection history modulates the risk of subsequent infection outcome is not entirely clear, partly because of the

* Corresponding author.

E-mail address: lpinto@ioc.fiocruz.br (L.M. de-Oliveira-Pinto).

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.001>

Received 8 March 2019; Received in revised form 24 May 2019; Accepted 6 June 2019

Available online 07 June 2019

0165-2478/ © 2019 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Federation of Immunological Societies.

OPEN **The inability of a dengue NS1 ELISA to detect Zika infections**

Monique da Rocha Queiroz Lima^{1*}, Thais Chouin-Carneiro¹, Elzinandes Azeredo¹, Luciana Santos Barbosa¹, Thiara Manuele Alves Souza¹, Jéssica Badolato Corrêa da Silva¹, Priscila Conrado Guerra Nunes¹, Márcia Dal Fabbro², Izilyanne H. Romanholi Facco², Rivaldo Venâncio-da-Cunha² & Flavia Barreto dos Santos^{1*}

The presence of dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV) and Chikungunya virus (CHIKV) in Brazil, may result in a difficult diagnosis due to the signs and symptoms shared by those. Moreover, as DENV and ZIKV belong to the same family, serological assays may show a high rate of cross-reactivity. Here, we evaluated a Dengue NS1 capture assay for early and differential diagnosis of dengue during the Zika epidemic occurred in Brazil in 2016. Samples (n = 227) from 218 patients included sera, plasma and urine from previously confirmed acute cases of Zika, dengue and Zika/dengue co-infections. Nine of those patients presented two specimens. The Dengue NS1 test was very specific for dengue diagnosis (99.32%), even in the co-circulation with ZIKV, and exhibited a high accuracy in not detecting acute Zika infections (92.43%). Our findings showed that the dengue NS1 capture test analyzed here was not able to recognize the ZIKV NS1 and its potential for cross-reaction.

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) belong to genus *Flavivirus* and are of a relevant impact for the public health. *Aedes* mosquitoes are the major vectors and are responsible for those arboviruses' transmission in the tropical and subtropical regions of the world¹. DENV infections can be caused by any of the four antigenically distinct serotypes (DENV 1 to 4) and can range from a nonspecific febrile illness to a more severe disease, characterized by thrombocytopenia, increased transaminases levels and plasma leakage, which may result in complications and death². ZIKV infected patients, typically present symptoms such as fever, rash, arthralgia, myalgia, fatigue, headache and conjunctival hyperemia^{3,4}. Despite the Zika-related congenital syndrome that may affect fetuses and babies, an infected person usually recovers completely, and fatalities are rare⁵.

DENV/ZIKV co-infections may occur where those viruses co-circulate, however the impact of those in the disease severity, is not fully known and requires further investigations. Some studies have reported arboviruses co-infected patients recovering after a mild clinical course of the disease⁶⁻⁸, but some may evolve with severe neurological manifestations⁹. Nevertheless, dengue differentiation from other arboviruses is crucial in endemic areas since an early diagnosis may allow the monitoring of potential markers for dengue severity.

In general, the signs and symptoms caused by those arboviruses are very similar and may be troublesome for differential diagnosis and patient management¹⁰. Due to the difficulties in clinically diagnosing those infections, the laboratory plays an important role. However, the tests should have maximum sensitivity, specificity and be simple, to provide an early support to patients by accurately differentiating dengue from Zika and other febrile diseases^{11,12}. Mainly, the laboratorial diagnosis of dengue and Zika relies on the molecular detection of the virus¹¹⁻¹³, however, a negative result does not exclude infection due to the low virus titer depending on the sample collection timeframe. The ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is still currently the simplest and most widely used diagnostic test¹¹, however, there is still a lack of commercially available serological test, sensitive and specific enough, to distinguish both viruses^{14,15}. Moreover, it has been shown that IgM, usually detected in most assays, is not considered a good confirmatory marker^{12,14,16}.

Similarly to dengue, the ZIKV non-structural protein 1 (NS1) is involved in viral replication, immune evasion and pathogenesis^{17,18}. Several NS1 ELISAs are commercially available for the early diagnosis of dengue, with good sensitivity and specificity¹⁹⁻²³. Some studies have also demonstrated high sensitivity and limited cross-reactivity, suggesting that NS1 may represent an efficient differential assay between DENV and ZIKV infections^{24,25}, as it has group-specific epitopes that potentially differentiates those viruses¹². A dengue NS1 test cross-reacting with ZIKV

¹Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, 21045-360, Brazil. ²Medical Clinic Department, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900, Brazil. *email: moniqueq@ioc.fiocruz.br; flaviab@ioc.fiocruz.br

Artigo 7: Sanches-Arcila, JC, Badolato-Corrêa, J, Souza, TMA, et al. **Clinical, virological and immunological profiles of DENV, ZIKV and/or CHIKV-infected Brazilian patients.** *Intervirology*. Aceito.

----- Mensagem original -----

Assunto:INT-2019-8-6 Accept manuscript

Data:25/06/2020 11:31

De:Intervirology <int@manuscriptmanager.net>

Para:elzinandes@ioc.fiocruz.br

Responder para:Jean-Claude Manuguerra <jean-claude.manuguerra@pasteur.fr>

Manuscript: INT-2019-8-6 - Clinical, virological and immunological profiles of DENV, ZIKV and/or CHIKV-infected Brazilian patients

Authors: Juan Camilo Sánchez-Arcila (Co-author), Jessica Badolato-Correa (Co-author), Thiara Manuelle Alves De Souza (Co-author), Iury Amancio Paiva (Co-author), Luciana Santos Barbosa (Co-author), Priscila Conrado Guerra Nunes (Co-author), Monique da Rocha Queiroz Lima (Co-author), Guillermo Coca Velarde (Co-author), Flavia Barreto Dos Santos (Co-author), Paulo Vieira Damasco (Co-author), Rivaldo Venancio Da Cunha (Co-author), Elzinandes Leal De Azeredo (Corresponding Author), Luzia Maria De Oliveira-Pinto (Co-author)

Date submitted: 2019-08-23

Dear Dr. De Azeredo

It is a pleasure to inform you that your manuscript is now acceptable for publication in *Intervirology* Switzerland.

Thank you,

Sincerely,

Jean-Claude Manuguerra

Editor-in-Chief 'Intervirology'

Associate Editor comments:

A well done work on the clinical characteristic, virological and immunologic profiles of these viral infections in Brazil

YOUR SIGN IN INFORMATION

Website: <https://www.manuscriptmanager.net/int>

Email: elzinandes@ioc.fiocruz.br

Forgot password or not signed in before?

Click the URL below to create/reset your password.

https://www.manuscriptmanager.net/sLib/v4/retrieve_pw.php?paramScreen=hUeKvPdsMN1h17emTmA9gfoaPr+jKLZxX9avFyZsus=

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ fui informado de que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre minha doença, que se chama DENGUE. **MINHA PARTICIPAÇÃO SERÁ APENAS PARA DOAR SANGUE DURANTE OU APÓS MEU ATENDIMENTO MÉDICO.** Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas com esta doença.

O procedimento será o seguinte: **UM VOLUME DE 5 ML OU DE 20 ML SANGUE** será obtido por punção da veia do antebraço, no mesmo momento em que for coletado sangue **PARA DOSAGEM DE PLAQUETAS E HEMATÓCRITO NECESSÁRIOS PARA CONHECER E CONTROLAR A GRAVIDADE DO MEU ESTADO. SEREI SOLICITADO A DOAR 5 OU 20 ML SANGUE UMA VEZ APÓS A RECUPERAÇÃO (ENTRE 1 A 2 MESES) COM A FINALIDADE DE CONFIRMAR A NORMALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

FOI-ME EXPLICADO QUE ESTA QUANTIDADE DE SANGUE REPRESENTA UMA PEQUENA PORÇÃO DO QUE POSSUO E SUA RETIRADA NÃO VAI ME PREJUDICAR.

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico do CRD. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local da punção, com duração de 3 a 5 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos exames e procedimentos não foram identificados riscos até o momento.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTERAMENTE VOLUNTÁRIA, E SOU LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU ME RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO A QUE DEVO RECEBER.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima sejam realizados na minha pessoa.

Nome: _____

Eu, responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário (a) no presente projeto de pesquisa.

Data: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Pesquisadores: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (021) 8755-7771

Dra. Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093

Anexo C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Seguimento clínico de gestantes com exantema e de seus filhos: estudo prospectivo de coorte

Pesquisador: CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 8

CAAE: 56913416.9.0000.5243

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Division of AIDS US National Institute of Allergy and Infectious Diseases

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.095.142

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1219136_E2.pdfem 17/09/2018) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

No início de 2015, o primeiro caso de infecção pelo ZIKV foi identificado no Brasil. Enquanto os primeiros casos foram identificados no Nordeste, até julho do mesmo ano, o Brasil relatou a presença da infecção pelo ZIKV em 12 estados. Até o final do ano, o Ministério da Saúde estimou que ocorreram entre 500.000 e 1,5 milhão casos do ZIKV em 2015. Porém, o impacto deste surto parece se estender para além dos sintomas de infecção aguda, e pode ter consequências para a saúde pública por longo prazo no Brasil. A magnitude da incidência e o espectro das manifestações clínicas associadas à epidemia atual do ZIKV na América Latina são sem precedentes. Uma nova síndrome chamada "síndrome congênita do ZIKV" (SCZ) foi reconhecida no Brasil que, na forma mais extrema, manifesta microcefalia¹. SCZ também inclui doença ocular com danos graves à retina, assim como calcificações no parênquima cerebral, ventriculomegalia, atrofia cerebral, defeitos do tubo neural e hidropsia fetal²⁻⁵. A evidência científica mostra que o ZIKV é neurotrópico e pode persistir em tecido neural². A persistência do vírus também é sugerida por

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049

UF: DF **Município:** BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 3.095.142

um número crescente de relatos na transmissão sexual do vírus, assim como transmissão transplacentária^{6,7}. Exceto nos casos da síndrome de Guillain-Barré em adultos, as vítimas mais afetadas são os recém-nascidos das mães infectadas pelo ZIKV durante a gravidez. Porém, até este momento, não há informações sobre os desfechos nos recém-nascidos expostos ao vírus sem lesões congênitas óbvias. É provável que a microcefalia seja apenas a "ponta do iceberg", e que os recém-nascidos "normais" das mães infectadas durante a gravidez podem apresentar transtornos cognitivos e déficits do desenvolvimento nos primeiros anos de vida. Tais déficits criarão desafios clínicos e comportamentais para essas crianças. O foco da nossa pesquisa é identificar esses déficits potenciais para auxiliar na elaboração de novas estratégias para lidar com este desafio emergente da saúde pública. O potencial para a epidemia da América Latina atual se disseminar globalmente torna essa uma meta urgente de investigação. ZIKV é um membro da família Flaviviridae - que inclui os vírus da dengue, chikungunya (família Togaviridae e do gênero Alphavirus), febre amarela, encefalite do leste do Nilo, encefalite St. Louis, e encefalite japonesa - e é transmitido por mosquitos do gênero Aedes. Ele é reconhecido por causar uma doença caracterizada por exantema, febre, conjuntivite e artralgia, e é endêmico em partes da África. Em 2007, tal patógeno causou uma epidemia nas Ilhas Yap, na Micronésia, que espalhou para a Polinésia Francesa em 2013 e 2014-12. No início de 2015, o vírus entrou no Brasil pela primeira vez (presumivelmente da Polinésia Francesa), se espalhou rapidamente pelo país e, posteriormente, para outros países na América do Sul, América Central e Caribe¹³. No meio do mesmo ano, casos da síndrome congênita chamada microcefalia começaram a ser notificados no Nordeste do Brasil em recém-nascidos de mães infectadas pelo ZIKV durante a gestação^{1,14,15}. Atualmente há evidência substancial que liga o ZIKV à microcefalia e outras doenças do sistema nervoso^{2,16}, assim como lesões oculares³⁻⁵. Estas manifestações clínicas graves em recém-nascidos motivaram a Organização Mundial da Saúde a declarar no final de 2015 ZIKV uma emergência de saúde pública e de interesse internacional. Embora o vírus tenha se disseminado para outros países, o Brasil é o epicentro desta epidemia. Segundo o Ministério da Saúde, entre o dia 22 de outubro de 2015 e o dia 28 de maio de 2016, 7.723 casos de suspeita de microcefalia ou outras malformações do sistema nervoso em recém-nascidos foram notificados (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=en). Ainda que a definição de microcefalia no Brasil tenha mudado durante a epidemia, um estudo mostrou que o número dos casos de microcefalia aumentou sem dúvidas no ano passado, em comparação com anos prévios¹⁴. Microcefalia associada com ZIKV foi relatada também no Panamá. ZIKV foi identificado no sangue do cordão umbilical de um recém-nascido, mas a mãe

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 3.095.142

apresentou resultados negativos para o vírus e não apresentou sintomas de infecção pelo ZIKV durante a gravidez (Pan American Health Organization, ZIKV Epidemiological Update, 24/03/2016). Porém, um teste negativo na mãe após o parto não indica que a mãe não foi infectada durante a gravidez. Sabe-se que há outras causas de microcefalia, incluindo sífilis congênita, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes e rubéola. Se os anticorpos IgG estão presentes e IgM ausentes no primeiro momento do exame pré-natal, eles são mais testados. Se ocorre soroconversão durante a gestação, o feto é considerado exposto à infecção intraútero. No Brasil foram relatados ao Ministério da Saúde 13.305 casos de sífilis congênita em 2013. Na investigação da microcefalia associada ao ZIKV têm sido excluídas as sífilis congênitas. Os exames para essas doenças são sorológicos, e, por este motivo, podem identificar se a mãe foi infectada em qualquer momento da gestação. Portanto, para melhorar o diagnóstico do ZIKV, apoiar a habilidade de fazer pesquisas nos desfechos de infecção pelo ZIKV na gravidez e aumentar nosso entendimento do impacto desta epidemia, é necessário que se tenha a capacidade de diagnosticar ZIKV por um exame sorológico, assim como fazer o diagnóstico diferencial com as outras doenças que causam exantema na mãe. Do início de novembro de 2015 a 26 de março de 2016, 322 casos de microcefalia foram notificados no Estado do Rio de Janeiro (Ministério da Saúde, Brasil). Em Niterói, localizado do outro lado da Baía de Guanabara, a nossa equipe de pesquisadores (grupo do Prof. Lee Riley da UC Berkeley e grupo da Profa Claudete Cardoso da UFF) tem colaborado nos últimos três anos em estudos de biomarcadores em uma coorte de crianças com tuberculose, assim como em transmissão vertical do HIV. Para a condução desses projetos nós criamos um grupo de pesquisa formado por alunos da graduação de medicina e uma pós-doutoranda americana (Kate Lovero), bolsista do programa Global Health Equity Scholars (ghes.berkeley) pela UC Berkeley. Na UFF em Niterói, nós estabelecemos um laboratório para ELISA, um sistema de gerenciamento de dados e um protocolo para seguir prospectivamente as crianças recém-diagnosticadas com tuberculose para medir os biomarcadores séricos a fim de monitorar a resposta do tratamento. Esta mesma infraestrutura será agora aplicada para este novo estudo de coorte em ZIKV.

HIPÓTESE

A nossa hipótese de pesquisa é que a microcefalia seja apenas a "ponta do iceberg" das crianças acometidas por Zika vírus, e que os recém-nascidos "normais" das mães infectadas durante a gravidez podem apresentar transtornos cognitivos e déficits do desenvolvimento nos primeiros anos de vida. Tais déficits criarão desafios clínicos e comportamentais para essas crianças. O foco da nossa pesquisa é identificar esses déficits potenciais para auxiliar na elaboração de novas

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 3.095.142

estratégias para lidar com este desafio emergente da saúde pública. O potencial para a epidemia da América Latina atual se disseminar globalmente torna esta uma meta urgente de investigação. A presença de exantema durante a estação chuvosa no Brasil pode significar dengue, chikungunya e mais recentemente infecção por ZIKV. Se tivermos como alvo a gestante que desenvolve exantema durante a gestação, nós iremos identificar mulheres cujos filhos foram expostos ao ZIKV. Tal patógeno pode ser detectado durante a doença aguda por RT-PCR, mas até 80% das pessoas infectadas pelo ZIKV podem ser assintomáticas e não procuram assistência médica durante a doença aguda. Por isso, é esperado que a maioria das gestantes infectadas por ZIKV não apresente sintomatologia durante a gravidez. Exames sorológicos, se incluídos nos testes de triagem pré-natal para avaliação de infecção relacionada a doença congênita, poderiam detectar infecção pelos flavivírus assintomática durante a gravidez e após o parto, porque tais exames medem anticorpos contra o vírus e não o próprio vírus no sangue, como RTPCR. O grupo do Prof. Lee Riley e outros pesquisadores de outras instituições estão atualmente desenvolvendo um novo teste sorológico para diferenciar ZIKV de dengue. As amostras contendo anticorpos IgM e IgG contra flavivírus por ELISA poderão ser testadas retrospectivamente uma vez que tais testes se tornem disponíveis. Portanto, a nossa equipe de pesquisa pretende desenvolver uma ferramenta laboratorial para o diagnóstico do ZIKV por meio de exames sorológicos (ELISA) nos pacientes atendidos na rede pública de Niterói-RJ, assim como desenvolver uma ferramenta molecular de detecção simultânea dos principais flavivírus via Pesquisadora Sílvia Maria Baeta Cavalcanti (Instituto Biomédico, UFF). Os exames sorológicos e os questionários clínicos em nosso estudo não são novos. Porém, qualquer resultado encontrado pode contribuir para o conhecimento relacionado aos desfechos da infecção pelo ZIKV na gravidez, uma vez que nada ainda é conhecido sobre os desfechos por longo prazo em crianças expostas intraútero ao vírus ZIKV. Além disso, o nosso objetivo de criar um repositório para amostras que contém ZIKV abre a possibilidade para pesquisas futuras, com um plano para o sequenciamento do genoma do vírus. Em projetos futuros nós pretendemos comparar os dados da sequência viral com as sequelas neurológicas e identificar posteriormente na coorte de crianças para determinar se esses desfechos clínicos desfavoráveis são associados a determinados tipos de cepas virais. No momento, o estudo proposto tem como objetivo organizar a coorte para um projeto de longo prazo.

METODOLOGIA

VI.1 – Tipo de estudo

Trata-se de estudo prospectivo de coorte.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 3.095.142

A população de estudo se constituirá de gestantes com exantema diagnosticado na presente gravidez ou nos seis meses anteriores à gestação.

O grupo de expostos será formado pelas gestantes com diagnóstico positivo de infecção pelo ZIKV por RT-PCR, e o grupo de não expostos será constituído pelas gestantes cujo diagnóstico do exantema não foi atribuído a ZIKV (neste grupo estão incluídas as gestantes com diagnóstico de toxoplasmose, rubéola, herpes, sífilis e citomegalovírus). Os desfechos clínicos incluirão microcefalia e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor da criança.

VI.2 - Locais de realização do estudo

O presente estudo será realizado no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense (HUAP-UFF), na Maternidade Municipal Alzira Reis (MMAR) e no Hospital Estadual Azevedo Lima (HEAL), em Niterói - RJ.

O atendimento clínico das participantes gestantes será realizado no Ambulatório de Obstetrícia das referidas unidades participantes do estudo. Os exames propedêuticos específicos (estudo da placenta, exame oftalmológico e avaliação radiológica) serão realizados nos respectivos serviços dentro do HUAP-UFF. O seguimento clínico e neurológico das crianças acontecerá no Ambulatório de Infectologia Pediátrica do HUAP-UFF.

VI.3 – Período de estudo

O período de inclusão no estudo será de abril de 2017 a março de 2018. Como o período de seguimento será de cinco anos após o nascimento, o período do estudo será até março de 2024.

É importante ressaltar que tal cronograma poderá sofrer mudança de acordo com a época de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

VI.4 – População de estudo

Serão incluídas neste projeto as gestantes com exantema, com diagnóstico positivo de infecção pelo ZIKV por RT-PCR, e/ou diagnóstico de infecção pelo grupo TORCHS, incluindo toxoplasmose, rubéola, herpes, sífilis e citomegalovírus, durante a gravidez, e os recém-nascidos destas mães. Para cada gestante com história de exantema será incluída uma sem exantema. Entre outubro de 2015 e março de 2016 (estação chuvosa), houve 700 casos notificados de gestantes com exantema em Niterói-RJ (informação verbal da Coordenação de Vigilância Epidemiológica de Niterói/RJ – COVIG), o que corresponde a cerca de 120 pacientes por mês. No mesmo período de outubro de 2015 e março de 2016 foram notificados à COVIG 11 casos de suspeita de microcefalia

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 3.095.142

(informação verbal da Coordenação de Vigilância Epidemiológica de Niterói/RJ – COVIG).

Os três hospitais do estudo somam juntos cerca de 4.000 partos/ano. Nós estimamos conservadoramente que 10% das gestantes irão desenvolver exantema durante a gestação. Através dos testes de triagem, nós iremos adicionalmente identificar gestantes assintomáticas infectadas por flavivírus. Portanto, nós esperamos recrutar 500 mães (e 500 crianças para a coorte) nos 18 meses do projeto.

Os recém-nascidos dessas mães serão avaliados por um período de cinco anos após o nascimento, com seguimento ambulatorial clínico e neurológico. Durante a avaliação dessas crianças serão também realizadas avaliação oftalmológica e radiológica, sendo a periodicidade das avaliações determinada pelos achados do exame inicial.

Além da inclusão no estudo através da gestante com exantema, também serão admitidas no estudo as crianças com ou sem microcefalia que as mães tiveram exantema, com exame de PCR positivo. A inclusão de tal população possibilitará o acompanhamento das crianças cujas mães não foram avaliadas no fluxograma estabelecido no projeto. Portanto, a entrada da criança na pesquisa acontecerá através da gestante ou após o nascimento. A METODOLOGIA NA ÍNTEGRA SE ENCONTRA DESCRITA NO PROJETO ANEXADO NESTA SUBMISSÃO.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

1. Gestantes adolescentes e adultas, diagnosticadas com exantema, diagnóstico positivo de infecção pelo ZIKV por RT-PCR, e/ou diagnóstico de toxoplasmose, rubéola, herpes, sífilis, citomegalovírus e HIV, acompanhadas nas instituições participantes no período de realização do estudo.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Ocorrência de hipóxia no período perinatal.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

- Construir uma coorte de gestantes e dos seus recém-nascidos para estudar o desenvolvimento de alterações neurológicas e déficits cognitivos em crianças com infecção intraútero pelo ZIKV.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 3.095.142

- Recrutar e diagnosticar clínica e laboratorialmente mulheres grávidas com exantema visando estabelecer uma coorte de gestantes, comprovadamente infectadas pelo ZIKV, gerando bebês com microcefalia e/ou outras anomalias neurológicas, que serão acompanhadas neste projeto assim como em futuros estudos para caracterização clínica, molecular e da patogênese da infecção vertical pelo ZIKV;
- Criar uma coorte de recém-nascidos oriundos de mães com exantema, de acordo com o objetivo acima, e/ou que foram infectadas pelo ZIKV e se mantiveram assintomáticas durante a gestação, sendo estas crianças avaliadas, clínica e laboratorialmente, até os cinco anos de vida, buscando possíveis sequelas do desenvolvimento e/ou cognitivas decorrentes da infecção pelo ZIKV;
- Criar um biorrepositório de amostras clínicas das gestantes e de seus filhos com quadro clínico de ZIKV, que poderiam ser analisadas posteriormente para a identificação de biomarcadores sorológicos e moleculares relacionados a resultados adversos em recém-nascidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Em se tratando de exposição ao ZIKV que potencialmente causa lesões a longo prazo na criança, presume-se que as mães tenham sentimento de insegurança durante o seguimento dessas crianças no serviço. Com o objetivo de minimizar o estresse emocional das mães, a equipe contará com uma assistente social do Ambulatório de Infectologia (Izabel Cristina Soares de Mello), que será responsável pelo acolhimento das mesmas no serviço, antes ser convidada a participar do estudo. Tal acolhimento terá como objetivo ouvir os anseios das mães visando auxiliar no entendimento dos motivos de apreensão da mesma. Nessa abordagem inicial pelo serviço social, os receios e os medos em relação ao desfecho clínico do bebê serão abordados. Nos casos em que a equipe julgar necessário, a mãe será encaminhada para avaliação e acompanhamento psicológicos, visando à sua abordagem integral e do seu bebê.

BENEFÍCIOS

O presente estudo pretende gerar subsídios que possam contribuir para o maior entendimento sobre os déficits em desenvolvimento infantil relacionados com a infecção pelo ZIKV em gestantes. Tais déficits criam desafios clínicos e comportamentais para estas crianças, e nossos resultados contribuirão para o desenvolvimento de estratégias para responder a este grave problema de saúde pública. Este estudo também estabelecerá um laboratório para o diagnóstico sorológico do ZIKV vírus. Este laboratório fornecerá um diagnóstico mais específico do ZIKV vírus, que melhorará o entendimento do impacto da infecção pré-natal pelo ZIKV, e como é diferente do impacto da

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.095.142

infecção pelo dengue e Chikungunya, nos recém-nascidos. Além disso, o laboratório servirá como um repositório de amostras de sangue coletado das mães infectadas pelo ZIKV para avaliação futura.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da Emenda 2 ao protocolo de pesquisa inicial que tem por objetivo:

Incluir alterações no projeto principal tais como:

1. Incluir a avaliação da resposta imune através da dosagem de citocinas e avaliação da função celular de gestantes e bebês em acompanhamento no nosso projeto.
2. Incluir a investigação do perfil molecular de gestantes e bebês em acompanhamento no nosso projeto através da identificação e quantificação de proteínas diferencialmente reguladas em soro.

Além disso, a emenda inclui duas unidades coparticipantes no estudo:

a) Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) – Laboratório de imunologia viral (LIV). Representada pela pesquisadora colaboradora Dr. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Pesquisadora titular do Laboratório de Imunologia Viral). CPF: 031.220.257-10

O objetivo de adicionar essa unidade coparticipante é a realização dos exames laboratoriais complementares propostos nos itens 1 e 3 do referido projeto. Segue em anexo a carta de anuência da instituição (arquivo Carta_Anuencia_FIOCRUZ_04092018). Quantidades de amostras biológicas suficientes serão enviadas para o LIV, visando o diagnóstico diferencial em casos suspeitos de outra arbovirose como dengue ou para a resposta humoral. A quantidade de amostra a ser enviada será a suficiente para a determinação laboratorial, não sendo necessário armazenamento de amostra restante, pois não sobrá.

b) Universidade de São Paulo (USP) – Laboratório de Glicoproteômica. Representada pelo pesquisador colaborador Dr. Giuseppe Palmisano (CPF: 704.988.881-85) O objetivo é incluir a análise proteômica baseada em espectrometria de massas, visando a identificação de moléculas possivelmente associadas aos desfechos clínicos das crianças expostas ao ZIKV (objetivos 1 e 3 do projeto original).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.095.142

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos na presente emenda.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1219136_E2.pdf	17/09/2018 10:16:03		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Acordo_entre_instituicoes_UFF_USP_31082018.pdf	12/09/2018 19:06:05	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Emenda_CEP_UFF_projeto_Zika_12092018.doc	12/09/2018 00:21:02	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Anuencia_USP_08092018.pdf	12/09/2018 00:13:10	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Anuencia_FIOCRUZ_04092018.pdf	12/09/2018 00:13:01	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Acordo_entre_instituicoes_UFF_Fiocruz_22082018pdf.pdf	12/09/2018 00:12:25	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_biorrepositorio_LAMAP_12092018.pdf	12/09/2018 00:11:45	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_v5_CONEP_12092018.docx	12/09/2018 00:11:21	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Relatorio_semestral_Projeto_Exantemas Coorte CEP_18042018.docx	18/04/2018 20:12:35	CLAUDETE APARECIDA	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.095.142

Outros	Relatorio_semestral_Projeto_Exantemas Coorte CEP 18042018.docx	18/04/2018 20:12:35	CARDOSO	Aceito
Outros	Emenda_Projeto_Zika_18042018.doc	18/04/2018 20:08:07	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	R8_Commitment_of_the_foreign_instituti on_LWR_02142017.doc	05/03/2017 08:38:28	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	R6_Biorepository_agreement_Port_Ingl_UFF_UCB_02212017.docx	05/03/2017 08:37:43	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	R6_Regulamento_biorrepositorio_CONEP_V1_10022017.docx	05/03/2017 08:37:31	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração do Patrocinador	R1_FundingDecision_LWR_02072017.doc	05/03/2017 08:36:42	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento_Zika_v5_CONEP_16022017.docx	05/03/2017 08:34:49	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_v4_CONEP_16022017.docx	05/03/2017 08:34:34	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Resposta_Parecer_CONEP_Projeto_Zika_2722017.docx	05/03/2017 08:34:14	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Resposta_Parecer_CONEP_Projeto_Zika_2722017.pdf	27/02/2017 17:42:15	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	R6_Biorepository_agreement_Port_Ingl_UFF_UCB_02272017.pdf	27/02/2017 17:36:03	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	R8_Commitment_of_the_foreign_instituti on_LWR_02142017.pdf	20/02/2017 00:18:18	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	R6_Regulamento_Biorrepositorio_LAMA P13022017.pdf	20/02/2017 00:15:59	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.095.142

Declaração do Patrocinador	R1_FundingDecision_LWR_02072017.pdf	20/02/2017 00:13:34	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento_Zika_v5_CONEP_16022017.pdf	20/02/2017 00:12:02	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_v4_CONEP_16022017.pdf	20/02/2017 00:11:36	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento_Zika_v4_CEP_21112016.pdf	21/11/2016 11:38:59	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Resposta_Parecer_Projeto_Zika_PB_15112016.pdf	21/11/2016 11:37:54	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Resposta_Parecer_Projeto_Zika_PB_07102016.pdf	20/10/2016 01:39:18	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento_Zika_v3_CEP_20102016.pdf	20/10/2016 01:36:33	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Regulamento_biorrepositorio_20102016.pdf	20/10/2016 01:36:11	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_v3_CEP_20102016.pdf	20/10/2016 01:32:22	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_LAMAP_Claudete_Cardoso.pdf	05/09/2016 00:29:41	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Carta_LAMAP_Jocemir_Lugon_31082016.pdf	05/09/2016 00:27:09	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Carta_coparticipante2.pdf	05/09/2016 00:25:34	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Outros	Carta_coparticipante1.pdf	05/09/2016 00:24:57	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento_Zika_v2_CEP_04092016.pdf	05/09/2016 00:19:49	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.095.142

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_v2_CEP_04092016.pdf	05/09/2016 00:19:13	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_HUAP_08062016.pdf	08/06/2016 23:47:29	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento_Zika_08062016.pdf	08/06/2016 23:46:23	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_final_CEP_08062016.pdf	08/06/2016 23:46:01	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_Zika.pdf	08/06/2016 23:45:17	CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 20 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conepe@saude.gov.br