

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Morganna Costa Lima

Neuroinflamação e Síndrome Congênita do Zika: Estudo da assinatura imune em líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com microcefalia e da infecção de células neuronais e endoteliais vasculares *in vitro*

Recife

2022

Morganna Costa Lima

Neuroinflamação e Síndrome Congênita do Zika: estudo da assinatura imune em líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com microcefalia e da infecção de células neuronais e endoteliais vasculares *in vitro*

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador:

Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

Coorientadoras:

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Dra. Elisa de Almeida Neves Azevedo

Recife

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- L732n Lima, Morganna Costa.
Neuroinflamação e Síndrome Congênita do Zika: estudo da assinatura imune em líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com microcefalia e da infecção de células neuronais e endoteliais vasculares in vitro / Morganna Costa Lima. — Recife: [s.n.], 2022.
166 p. : il., graf. tab. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.
Orientador: Rafael Freitas de Oliveira França; coorientadoras: Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, Elisa de Almeida Neves Azevedo.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde
1. Vírus Zika - imunologia. 2. Infecção por Zika vírus - imunologia. 3. Neuroinflamação. 4. Resposta imune inata. 5. Microcefalia - imunologia. 6. Microcefalia - patologia. 7. Sistema nervoso central - imunologia. 8. Sistema nervoso central - patologia. 9. Sistema nervoso central - virologia. 9. Inflamação - imunologia. 10. Inflamação - patologia. 11. Interferonopatias. 12. Interferon-alfa - líquido cefalorraquidiano. 13. Interferon-alfa - imunologia. 14. Citocinas - análise. I. França, Rafael Freitas de Oliveira. II. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. III. Azevedo, Elisa de Almeida Neves. IV. Título.

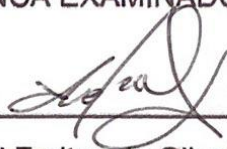
Morganna Costa Lima

Neuroinflamação e Síndrome Congênita do Zika: estudo da assinatura imune em líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com microcefalia e da infecção de células neuronais e endoteliais vasculares *in vitro*

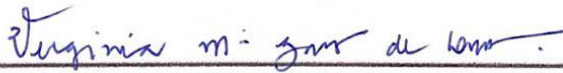
Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 29/03/2022

BANCA EXAMINADORA



Dr. Rafael Freitas de Oliveira França
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Priscila Mayrelle da Silva Castanha
Universidade de Pernambuco/University of Pittsburgh

Dr. Sérgio Oliveira de Paula
Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Aos meus avós maternos – Dona Lourdes e Sr. Napoleão (*in memoriam*) –,
que são os grandes amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a Deus, simplesmente pelo fato de que Ele me amou primeiro. Porque antes que eu pudesse imaginar realizar tal feito, Ele já tinha sonhado tudo para mim.

Aos meus avós maternos (in memoriam). Vovô Napa, obrigada por sua alegria e irreverência contagiante. Vovó Lulu, por ser meu maior exemplo de bondade e humildade.

Aos meus pais, Rita Aparecida e José Quitério, que me ensinam todos os dias sobre amor, integridade e respeito. Obrigada pela liberdade, confiança e autonomia para viver o meu propósito, na mesma proporção de nunca me deixarem esquecer de que “eu tenho para onde voltar”.

À minha irmã Karol, por todo esforço e fé que essa menina de luz representa. Eu te admiro e te amo muito.

À toda minha família, de sangue e de consideração, que sempre me incentiva e encoraja a buscar o novo. Obrigada por todo o amor e cuidado a mim dedicados. Cito especialmente minha tia Cleide, um exemplo de força e resiliência.

A Davi, meu primo e afilhado, por quem tenho maior amor, e desejo ser um exemplo de ser humano.

Ao meu orientador, o Dr. Rafael França, por todo o conhecimento compartilhado comigo durante estes anos. O agradeço principalmente pela oportunidade e confiança a mim conferidas.

Às minhas coorientadoras, Dra. Clarice Morais e Dra. Elisa Azevedo, duas mulheres admiráveis, por quem cultivo enorme carinho e respeito.

Aos membros da banca avaliadora, gostaria de evidenciar a estima que tenho por vocês. Obrigada pelo aceite do convite e por todas as considerações que tendem a melhorar ainda mais este trabalho.

À Fiocruz, em especial ao Instituto Aggeu Magalhães, que foi a minha casa nos últimos seis anos. Muito obrigada a todos os profissionais que fazem desta instituição uma referência para o desenvolvimento científico no Nordeste e no Brasil.

Aos meus amigos do Departamento de Virologia, o meu muito obrigado pelas sessões de café e terapia, que salvaram muitos dos nossos dias por aqui. Fernando, Camila Fernandes, Camila Adan, Débora Lopes, Willyenne, Renata, Jefferson e Sr. Paulo, vocês com certeza deixaram os meus dias mais leves.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, pessoas com as quais tive o prazer de trabalhar ao longo destes anos. Posso dizer que os considero FAMÍLIA. Sem a ajuda de todos vocês – Renan, Pedro, Thaíse, Verônica, Leila, Thaís, Elidiane, Armando, Gabriela, Irassandra, Sayonara e Amanda, esse trabalho não seria possível.

Não há palavras que descrevam o tamanho do meu amor por essas meninas: Elisa, Marília, Klarissa, Marjorie e Tâmisa. Com vocês aprendo a ser humana. Obrigada por tudo e tanto!

Karol, Gabriella, Sabrine, Samara, Marianny, Flávia, Luana, Henrique, Gabriel, Ana Luiza: Deus nos escolheu. Somos irmãos. Estamos lá uns para os outros desde crianças. Ultrapassa gerações. A gente se escolhe todos os dias. Obrigada por isso! De Papagaio para o mundo!

Por fim, eu gosto de gente que me joga para frente! É isso que todos vocês provocam em mim. O meu mais sincero OBRIGADA! E quando pensarem em desistir, lembrem-se: tudo passa!

“Eu nasci para a LIBERDADE,
e para isso,
é preciso CORAGEM!”
(LIMA, 2022)

RESUMO

LIMA, Morganna Costa. **Neuroinflamação e Síndrome Congênita do Zika:** estudo da assinatura imune em líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com microcefalia e da infecção de células neuronais e endoteliais vasculares *in vitro*. 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A Síndrome Congênita do Zika (SCZ) parece estar relacionada à causa multifatorial. Apesar da função protetora, a neuroinflamação tem sido apontada como um dos processos chave para o desenvolvimento da SCZ, uma vez que a desregulação desta resposta está associada a efeitos deletérios graves no Sistema Nervoso Central (SNC). Este trabalho avaliou o perfil imune da infecção congênita por ZIKV em LCR de crianças com microcefalia *versus* controle, e em ensaios *in vitro*, pelo uso de células de linhagem neuronal (células SH-SY5Y) e endoteliais vasculares cerebrais (HBMECs). Foram observados aumentos significativos de IFN- α , CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10 nas amostras de LCR do grupo microcefalia (n=51) *versus* controle (n=27). Corroborando com esses dados, o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-12p70) foram detectadas no sobrenadante de células SH-SY5Y infectadas por ZIKV. Além disso, ensaios de expressão gênica demonstraram que o ZIKV induz aumento dos transcritos de *TLR3*, *IFNA1*, *IFNB1*, *MMP-1*, -3 e -9, e reduz a expressão de *MMP2*. A inibição parcial da via de IFN potencializa os efeitos da infecção, ocasionando aumento no percentual de células apoptóticas, maior replicação viral, redução nos níveis de CXCL-8/IL-8, CXCL-10/IP-10, CCL2/MCP-1 e CCL-5/RANTES. A ativação da via MAPK p38 também foi observada. As HBMECs demonstraram suscetibilidade e permissividade à infecção ao ZIKV, o qual utiliza o citoesqueleto de actina para produção da nova progênie viral. Em consequência da infecção, estas células produzem TNF e diminuem a expressão de MMP-9. MMP 1, 2 e 3, ICAM-I e VCAM-1, no entanto, não foram alterados pela infecção. Nossos achados contribuíram para a identificação de moléculas imunes essenciais à resposta inflamatória frente à infecção por ZIKV, as quais podem ser utilizadas como base para o estudo de estratégias terapêuticas e profiláticas que auxiliem no controle da resposta imune em grávidas e recém-nascidos.

Palavras-chave: vírus Zika; síndrome congênita do Zika; neuroinflamação; resposta imune inata.

ABSTRACT

LIMA, Morganna Costa. **Neuroinflammation and Congenital Zika Syndrome:** Study of the immune profile in microcephaly children cerebrospinal fluid (CSF) and of the in vitro neuronal and vascular endothelial cells infection. 2022. Tesis (Doctorate degree in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Congenital Zika Syndrome (CZS) seems to be related to multifactorial causes. Despite its protective function, neuroinflammation has been identified as one of the key processes for the CZS development. This imbalance response is associated with severe deleterious effects on the central nervous system (CNS). This work evaluated the immune profile of congenital ZIKV infection in cerebrospinal fluid (CSF) of children with microcephaly versus control, and in in vitro assays using neuronal lineage cells (SH-SY5Y cells) and cerebrovascular endothelial cells (HBMECs). Significant increases in IFN- α , CXCL-9/MIG and CXCL-10/IP-10 were observed in CSF samples of microcephaly group (n=51) versus control (n=27). Corroborating with these data, increased production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and IL-12p70) were detected in the supernatant of SH-SY5Y infected cells by ZIKV. In addition, gene expression assays showed that ZIKV induces overexpression of *TLR3*, *IFNA1*, *IFNB1* *MMP 1*, 3 and 9 transcripts, while reducing the expression of *MMP2*. Partial inhibition of IFN pathway intensifies the infection causing an increase in the percentage of apoptotic cells and greater viral replication. In addition, there is a reduction on CXCL-8/IL-8, CXCL-10/IP-10, CCL2/MCP-1 and CCL-5/RANTES levels. MAPK p38 pathway activation was also observed on infected neuronal cells. Endothelial cells showed susceptibility and permissiveness to ZIKV infection which uses the actin cytoskeleton to produce new viral progeny. As a result of the infection, HBMECs produces TNF and reduces *MMP9* expression. *MMP 1*, 2 and 3, ICAM-1 and VCAM-1, however, were not altered by the infection. Our findings contributed to the identification of essential immune molecules in the inflammatory response against ZIKV infection. Which may suggest its uses as a basis for therapeutic and prophylactic strategies that can support the immune response control on pregnant women and newborns.

Keywords: Zika virus; congenital Zika syndrome; neuroinflammation; innate immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura e genoma do ZIKV	22
Figura 2- Distribuição geográfica do ZIKV	24
Figura 3- Vias de transmissão do ZIKV	27
Figura 4- Ciclo biológico viral e patogênese	29
Figura 5- Manifestações clínicas da SCZ	33
Figura 6- Neuropatogênese da infecção congênita por ZIKV	38
Figura 7- Via de sinalização do IFN-I (α/β)	42
Figura 8- Infecção por ZIKV e mecanismos de evasão imune	45
Figura 9- Vias pró-inflamatórias parcialmente dependentes do IFN-I (α/β)	47
Figura 10 - Neuroinflamação e quebra de barreira hematoencefálica mediada por Flavivírus	59
Figura 11- Neurogênese	61
Figura 12- Estrutura e organização da BHE	64
Figura 13- Perfil imune em LCR de RNs com microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV	87
Figura 14- Caracterização da infecção de células SH-SY5Y por ZIKV	89
Figura 15- Expressão de MMPs em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV	91
Figura 16- Expressão de TLRs e IFN-I (α/β) em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV	92
Figura 17- Efeitos da inibição do IFN-I α em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV	94
Figura 18- Inibição de p38 e a modulação da resposta imune em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV	96
Figura 19- Caracterização da infecção de HBMECs por ZIKV	98
Figura 20- Expressão de MMPs em HBMECs infectadas com ZIKV	99
Figura 21- Influência da infecção por ZIKV na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECS	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD	7-aminoactinomicina D
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
BMVECs	<i>Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
BPL	Betapropiolactona
C	Proteína do Capsídeo
CBA	<i>Cytometric Beads Assay</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CD	Células Dendríticas
cGAS	GMP-AMP sintase cíclica
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetilcelulose
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAMPs	<i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>
DENV	Vírus Dengue
DMEM	<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i>
E	Proteína do Envelope
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
F12	<i>Ham's F12 Medium</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HBMECS	<i>Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
HPI	<i>Horas Pós-Infecção</i>
HSV	Vírus Herpes Simplex
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFNAR	<i>IFN-I α/β Receptors</i>
IFN-I α/β	Interferon-I α/β
Ig	Imunoglobulina
IKK α/β	<i>IκB Kinase α e β</i>
IL	Interleucina
INPs	<i>Intermediate Neural Progenitors</i>
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>

IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISGF-3	<i>Interferon Stimulated Genes Factor 3</i>
ISGs	<i>Interferon stimulated genes</i>
JA	Junções Aderentes
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JAMs	<i>Junction Adhesion Molecules</i>
JE	Junções Estreitas
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
JNK/SPK	<i>c-Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase</i>
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
LCR	líquido cefalorraquidiano
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen 1</i>
M	Proteína de Membrana
M199	<i>Medium 199</i>
MACs	Moléculas de Adesão Celulares
MAPK	STAT
MAPK/ ERK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase/ Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signaling (MAVS) Protein</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation Antigen 5</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractante Protein 1</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha</i>
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MyD88	<i>Adaptor Molecule Myeloid Differentiation 88</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>

NIK	<i>NF-κB-Inducing Kinase</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NS1	<i>Non-structural protein 1</i>
NS2A	<i>Non-structural protein 2A</i>
NS2B	<i>Non-structural protein 2B</i>
NS3	<i>Non-structural protein 3</i>
NS4A	<i>Non-structural protein 4A</i>
NS4B	<i>Non-structural protein 4B</i>
NS5	<i>Non-structural protein 5</i>
NSCs	<i>Neural Stem Cells</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PEN	<i>Penicillin</i>
PJA	Proteínas de Junção Aderentes
PJE	Proteínas de Junção Estreitas
pPIA	<i>Peptidylprolyl Isomerase A</i>
prM	Proteína pré-membrana
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RIG-1	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene-1</i>
RLRs	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene-1 (RIG)-1-like Receptors</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>

STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription Factor</i>
STING	<i>Stimulator of Interferon Genes</i>
STREP	<i>Streptomycin</i>
TBK-1	<i>TANK-Binding Kinase 1</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR Domain-containing Adaptor Inducing IFN β</i>
TYK2	<i>Tyrosine Kinase 2</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VFA	Vírus da Febre Amarela
VLA4	<i>Very Late Antigen 4</i>
VNO	Vírus do Nilo Ocidental
ZIKV	Vírus Zika
ZO	Zônula-occludens

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	20
2.1 Descoberta e Caracterização de um Novo Vírus	20
2.2 Recentes epidemias de ZIKV	23
2.3 Dinâmica de Transmissão	25
2.4 Infecção e imunidade: uma guerra sem vencedor?	27
2.5 Patogênese e manifestações clínicas	30
2.5.1 ZIKV e condições neurológicas no adulto (SGB)	30
2.5.2 Síndrome Congênita do Zika: fato ou fake?	31
2.6 Manejo clínico-laboratorial do paciente com ZIKV	34
2.7 Mecanismos envolvidos na infecção congênita	36
2.8 Via do IFN-I (α/β) e imunidade antiviral	40
2.9 Evasão imune: mecanismos associados à supressão da via do IFN	43
2.10 Inflamação: um mecanismo de defesa vital a saúde	45
2.10.1 Via do NF- κ B	49
2.10.2 Via de sinalização MAPK	51
2.10.2.1 Via MAPK p38	52
2.10.2.2 Via de transdução de sinal JNK (c-Jun)	53
2.11 Neuroinflamação: uma <i>thread</i> comum das infecções virais	54
2.11.1 Neurogênese: um breve resumo	60
2.11.2 Barreira Hematoencefálica: estrutura e organização	62
3 JUSTIFICATIVA	68
4 OBJETIVO GERAL	69
4.1 Objetivos específicos	69
5 MATERIAL E MÉTODOS	70
5.1 Local do Experimento	70
5.2 População do estudo	70
5.3 Desenho do estudo	71
5.4 Ensaio Multiplex	71
5.5 Linhagens Celulares	72
5.5.1 Células SH-SY5Y (ATCC® CRL2266™)	72
5.5.2 HBMECs	72

5.6 Vírus Zika	72
5.6.1 <i>Identificação da amostra viral</i>	73
5.6.2 <i>Produção do estoque viral</i>	73
5.6.3 <i>Titulação do estoque viral</i>	73
5.7 Infecção de células SH-SY5Y com ZIKV	73
5.8 Inativação viral com BPL e ensaio de placa	74
5.9 Inibição de IFN-α em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV	75
5.10 Inibição de p38 em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV	75
5.11 Infecção de HBMECs por ZIKV	76
5.12 Inibição do citoesqueleto de actina em HBMECs infectadas por ZIKV	76
5.13 Análise de morte celular	77
5.14 Citometric Bead Array (CBA)	77
5.15 Extração de RNA viral	78
5.16 Quantificação viral por RT-qPCR	78
5.17 Extração de RNA celular total e confecção do cDNA	79
5.18 Análises de expressão gênica	79
5.19 Immunoblot	80
5.19.1 <i>Preparação dos extratos proteicos</i>	80
5.19.2 <i>Western blotting</i>	81
5.20 Marcação de ICAM-1 e VCAM-1	81
5.21 Análises estatísticas	82
5.22 Aspectos éticos	82
6 RESULTADOS	84
6.1 Caracterização das amostras clínicas incluídas no estudo	84
6.2 RNs com microcefalia associada a infecção congênita por ZIKV apresentam concentrações elevadas de mediadores pró-inflamatórios no SNC	85
6.3 O ZIKV infecta células SH-SY5Y e induz apoptose e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias	88
6.4 O ZIKV modula a expressão de MMPs em células SH-SY5Y	90
6.5 O ZIKV altera a expressão de <i>TLR-3</i>, <i>IFNA1</i> e <i>IFNB1</i> em células SH-SY5Y	91
6.6 A inibição de IFN-α modula a resposta de células SH-SY5Y frente à infecção por ZIKV	92
6.7 A resposta pró-inflamatória de células SH-SY5Y infectadas por ZIKV é parcialmente dependente da fosforilação de p38	95

6.8 O citoesqueleto de actina facilita a replicação do ZIKV em HBMECs que produzem citocinas pró-inflamatórias	97
6.9 Expressão de MMPs em HBMECs infectadas com ZIKV	98
6.10 Expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECs	99
7 DISCUSSÃO	101
8 CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	111
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IAM/FIOCRUZ.....	129
ANEXO B – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS RNs INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	130
ANEXO C – ARTIGO COMPLETO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA E COM COMPROVADA RELAÇÃO COM O PROJETO DE TESE	153

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome Congênita do Zika (SCZ) é, sem dúvidas, uma das maiores preocupações acerca da infecção pelo vírus Zika (ZIKV) (MUSSO; KO; BAUD, 2019). Caracterizada por um conjunto de malformações fetais e neurológicas graves, que compreende anomalias craniofaciais, restrição do crescimento fetal, artrogripose, comprometimento ocular e perda auditiva (LEAL et al., 2016; MARQUES et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020). A relação entre a infecção por ZIKV e o comprometimento fetal ocorreu durante a epidemia que atingiu o Brasil e diversos países da América, entre os anos de 2015 e 2016 (MARQUES et al., 2019; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Neste período, estima-se que a SCZ tenha atingido um total de 757.703 crianças distribuídas em 26 países do Continente Americano (MARQUES et al., 2019).

Uma série de estudos vêm sendo conduzidos, na tentativa de compreender os mecanismos fisiopatológicos da síndrome (LIMA et al., 2019a; TANG et al., 2016; VAN DEN POL et al., 2017). Condições fisiológicas, mutações virais, fatores genéticos do hospedeiro e fatores ambientais, têm sido frequentemente associados (BARBEITO-ANDRÉS et al., 2020; CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; ROSSI et al., 2019; SCREATON; MONGKOLSAPAYA, 2017a; YUAN et al., 2017). No entanto, o neurotropismo viral direto e a resposta inflamatória que ocorre dentro do Sistema Nervoso Central (SNC), parecem ser imprescindíveis para o seu estabelecimento (ALIMONTI et al., 2018; FERRARIS et al., 2019; LIMA et al., 2019a; MINER; DIAMOND, 2017; MUSSO; KO; BAUD, 2019; TANG et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2020).

Alterações relacionadas ao neurodesenvolvimento, apoptose e inflamação, já foram identificadas em células neurais infectadas por ZIKV (DANG et al., 2016; OJHA et al., 2018; TANG et al., 2016). Simultaneamente, a interação do vírus com os Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) dão início a imunidade antiviral (BARROWS et al., 2018; KIM et al., 2019). A ativação da via do Interferon- α/β (IFN-I α/β) desencadeia uma cascata de eventos que incluem fosforilação de proteínas quinase, liberação de mediadores inflamatórios, recrutamento e ativação de células imunes e ativação do sistema complemento, favorecendo uma atuação integrada das imunidades inata e adaptativa (celular e humoral) (GARCIA et al., 2017; KIM et al., 2019; NOORBAKHSH et al., 2019; SCHIELA et al., 2018).

As células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMECs, do Inglês, *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*), principais componentes da Barreira Hematoencefálica (BHE), também auxiliam na regulação imune do SNC (KLEIN et al., 2019; SONAR; LAL, 2018). Nas infecções por vírus neurotrópicos, facilitam a comunicação sangue e cérebro, uma vez que regulam a passagem de patógenos, células e outras moléculas através da via hematoencefálica (KLEIN et al., 2019; LI et al., 2015; AL-OBAIDI et al., 2018). Além disso, dirigem a resposta imune local pela liberação de mediadores inflamatórios e aumento da expressão de moléculas de adesão celulares (AL-OBAIDI et al., 2018; HSIEH et al., 2019; LI et al., 2015; ROE; ORILLO; VERMA, 2014). Juntos, esses fatores contribuem para a migração de células imunes, além de modular a expressão de proteínas necessárias à estabilidade de BHE (KLEIN et al., 2019). As metaloproteinases de matriz (MMPs), por exemplo, dirigem processos de angiogênese, neurogênese, remodelação sináptica, degradação de matriz extracelular e apoptose (SPINDLER; HSU, 2012; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011).

A desregulação da resposta pró-inflamatória, perda de estabilidade endotelial e o desencadeamento de alterações na estrutura e funcionamento do SNC, já têm sido descritos para alguns Flavivírus, como o Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e Vírus do Nilo Ocidental (VNO) (AL-OBAIDI et al., 2018; HSIEH et al., 2019; KLEIN et al., 2019; AL-OBAIDI et al., 2018; MUSTAFÁ et al., 2019; ROE; ORILLO; VERMA, 2014). Baseado nesses dados, acredita-se na imunopatologia da SCZ como um processo dinâmico, que envolve a interação da resposta imune local e periférica (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; DIOP et al., 2018; LIMA et al., 2019; MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016). No entanto, os mecanismos de interação ZIKV e hospedeiro, que determinam os quadros congênitos da infecção, ainda não são bem compreendidos.

Uma hipótese relevante é que ao acessar a unidade neurovascular, o ZIKV induz uma resposta pró-inflamatória persistente baseada na liberação de IFN-I e outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A produção dessas moléculas, assim como a presença do vírus no SNC, ativa células imunes locais e a BHE, promovendo a amplificação da resposta neuroinflamatória. Conseqüentemente, o fluxo de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, assim como a liberação de substâncias neurotóxicas aumentam, gerando danos permanentes ao desenvolvimento fetal e infantil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

Os tópicos a seguir abordam uma revisão acerca dos mecanismos imunopatogênicos associados à infecção congênita por vírus Zika. Além disso, aspectos gerais relacionados a epidemiologia, transmissão, diagnóstico e tratamento, também são retratados.

2.1 Descoberta e Caracterização de um Novo Vírus

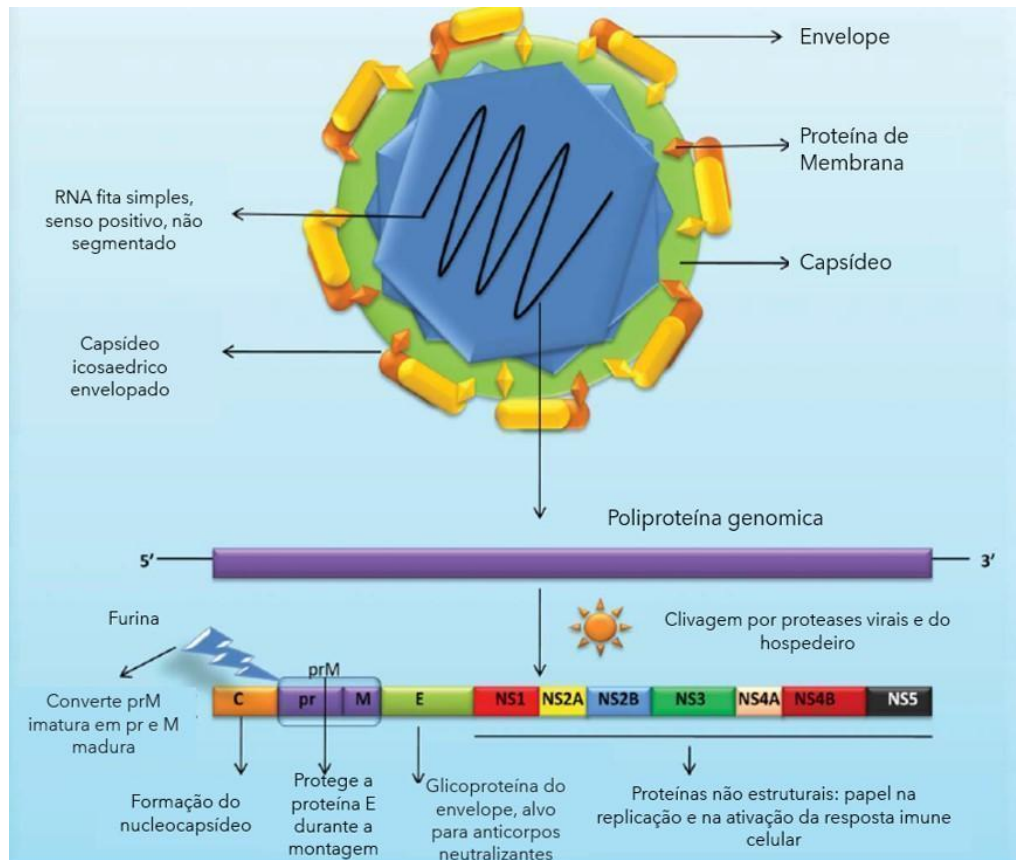
A emergência e reemergência dos Arbovírus – vírus transmitidos por artrópodes – são de grande importância para a saúde pública resultando em epidemias em todo o mundo (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019). Dentre os principais, destacam-se os Vírus Dengue (DENV 1-4), Vírus da Febre Amarela (VFA), Vírus Chikungunya (CHIKV) e o Vírus Zika (ZIKV), os dois últimos com histórico epidemiológico importante nas últimas décadas, principalmente nas Américas (ESPINAL et al., 2019; LETA et al., 2018). Todos estes vírus estão relacionados com morbidade e mortalidade na população atingida e requerem medidas de controle anual para evitar novas epidemias (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019; JONES et al., 2020). A introdução do ZIKV no continente americano, promoveu uma pandemia sem precedentes após anos de circulação restrita aos continentes africano e asiático (ESPINAL et al., 2019; KAZMI et al., 2020).

O ZIKV foi, ocasionalmente, descoberto em 1947 na floresta de Zika em Uganda, isolado de um macaco Rhesus que se apresentava com febre durante um estudo para o VFA (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). No ano seguinte, o vírus foi detectado em um *pool* de mosquitos *Aedes africanus* coletados nesta mesma região (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O isolamento do ZIKV em momentos distintos e de maneira independente, junto com suas características patogênicas e ausência de neutralização para os vírus da VFA e Dengue, confirmaram então a existência de um novo vírus (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Somente em 1952 a primeira infecção em humanos foi então relatada e a disseminação esporádica em diferentes regiões daquele Continente foi observada (SAKKAS; ECONOMOU; PAPADOPOULOU, 2016; SMITHBURN, 1952).

Após sua identificação, o ZIKV foi caracterizado como um *Flavivirus*, devido a sua similaridade com outros vírus que compõem este gênero, como por exemplo, DENV, VFA, o Vírus do Nilo Ocidental (VNO) e o Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (HAYES, 2009; SAKKAS; ECONOMOU; PAPADOPOULOU, 2016). Estes vírus apresentam uma estrutura característica formada por um capsídeo icosaédrico, envolto por envelope lipídico e que tendem a apresentar um alto índice de reatividade cruzada quando cocirculantes em uma mesma região (CASTANHA et al., 2020; DAI et al., 2016; HASAN et al., 2018). Quanto ao genoma, apresentam um RNA fita simples (~11 kb), polaridade positiva, e que contém uma única região de leitura aberta (ORF, do Inglês, *Open Reading Frame*), a qual codifica uma poliproteína única (HASAN et al., 2018). Através da clivagem da poliproteína, são geradas três proteínas estruturais (capsídeo [C], envelope [E] e pré-membrana [prM]) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que participam tanto da formação da nova progênie viral, como de processos celulares de infecção e desencadeamento da resposta imune no hospedeiro (ASIF et al., 2017; HASAN et al., 2018) (Figura 1).

Ainda sobre o processo de identificação e caracterização do ZIKV, alguns estudos filogenéticos foram realizados, o que permitiu identificar a origem e heterogeneidade de diferentes cepas do vírus (HU et al., 2019; LOWE et al., 2018; METSKY et al., 2017; RAJAH et al., 2016). Através do sequenciamento do seu genoma completo foi possível confirmar que as duas linhagens – Africana e Asiática – atualmente existentes do ZIKV são um produto da evolução da cepa africana ancestral e ambas apresentam uma ampla distribuição geográfica (RAJAH et al., 2016). Devido a sua grande heterogeneidade, a linhagem Africana foi subdividida em dois clusters, um da África Oriental e outro da África Ocidental (KAZMI et al., 2020; LOWE et al., 2018).

Figura 1- Estrutura e genoma do ZIKV



Fonte: Singh *et al.*, (2016, tradução da autora).

Legenda: O genoma do ZIKV é composto por RNA fita simples, com polaridade positiva, que codifica uma poliproteína única. A partir de sua clivagem, realizada por proteases virais e do hospedeiro, são geradas 3 proteínas estruturais: Capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E) que irão favorecer a formação de novos vírions; e, sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, essenciais à replicação viral e indução da resposta imune no hospedeiro.

Quanto a cepa asiática, desde que surgiu no Oceano Pacífico e na América do Sul, tem demonstrado alta capacidade de disseminação e apresenta mutações e características imunopatogênicas particulares, quando comparada à cepa africana (HU *et al.*, 2019; KAZMI *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2019c; METSKY *et al.*, 2017). Dentre estas últimas, podem-se destacar as cepas isoladas no Brasil, primeiras associadas com o desencadeamento da microcefalia e anormalidades congênitas, além do uso de novas vias de transmissão para o estabelecimento da infecção (CALVET *et al.*, 2016; FARIA *et al.*, 2016). Indagações sobre a circulação de cepas africanas do ZIKV no Brasil foram recentemente levantadas, trazendo preocupações acerca de uma nova epidemia, visto que a população é naive para essa linhagem (ALMEIDA *et al.*, 1947; KASPRZYKOWSKI *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2019). A hipótese surgiu a partir de estudos que identificaram linhagens filogeneticamente

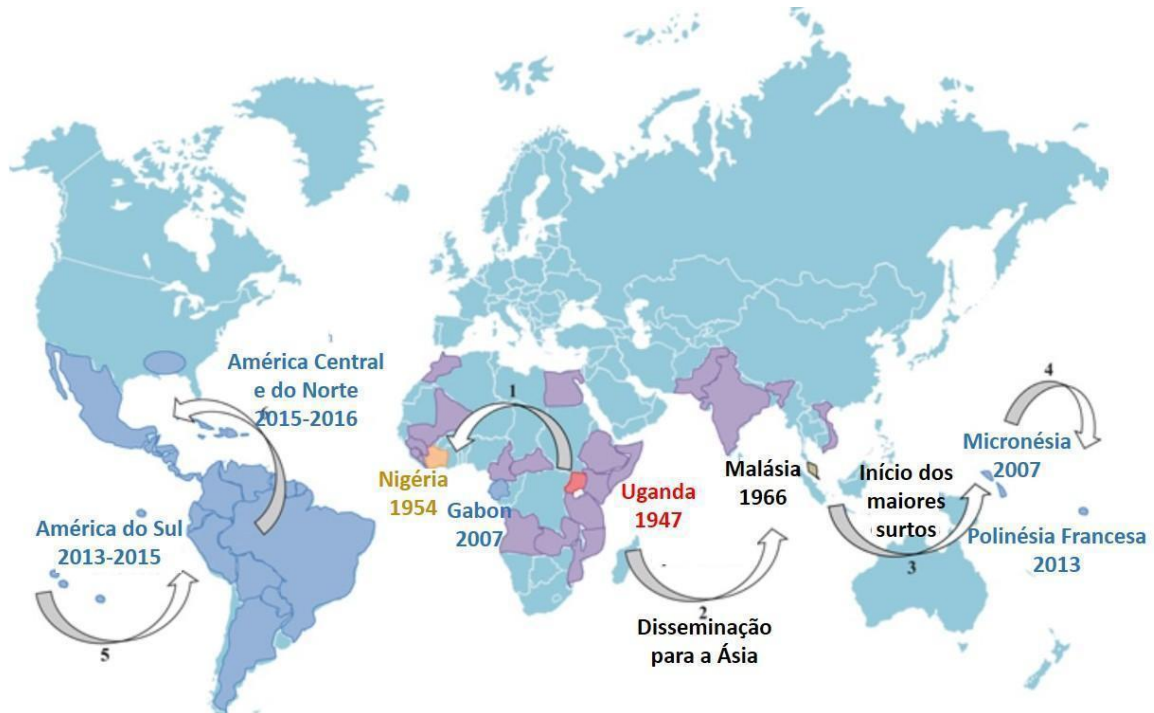
similares a MR766 em solo brasileiro (ALMEIDA et al., 1947; KASPRZYKOWSKI et al., 2020; MELLO et al., 2019). Estas, foram isoladas tanto de macacos *Alouatta guariba* quanto de mosquitos *Aedes albopictus* e *Haemagogus leucoceanos* e correspondem a 5,4% das cepas que circularam no país em 2019 (ALMEIDA et al., 1947; KASPRZYKOWSKI et al., 2020; MELLO et al., 2019).

2.2 Recentes epidemias de ZIKV

A primeira infecção humana por ZIKV foi relatada em 1952, no continente africano, região onde o vírus apresentava dispersão muito lenta (SMITHBURN, 1952). Somente quase 40 anos após a sua descoberta (1983) é que o ZIKV cruzou as fronteiras do solo africano e chegou ainda de maneira irrisória ao continente asiático (PIELNAA et al., 2020). Foi então que nos anos 2000 o vírus começou a escrever um novo capítulo na história da saúde pública humana (CAO-LORMEAU et al., 2014; DUFFY et al., 2009; PIELNAA et al., 2020). Em 2007, causou uma epidemia que atingiu 70% da população da Ilha de Yap no Estados Federados da Micronésia, seguida por uma introdução eficiente na Polinésia Francesa (2013), infectando 63% da sua população (CAO-LORMEAU et al., 2014; DUFFY et al., 2009). Nesta época, houve um aumento nos casos de aborto e alterações congênitas, mas estudos que sugerissem a associação dessas condições à exposição ao ZIKV somente foram relatados em 2016, através de análise retrospectiva (CAUCHEMEZ et al., 2016) (Figura 2).

Com a sua chegada ao Brasil o ZIKV se tornou o protagonista de uma epidemia que atingiu uma média de 440.000 a 1.300.000 pessoas, com a maior concentração de casos, cerca de 40% deles, na região nordeste do País (DEMIR; KILIC, 2016; FARIA et al., 2017). Desde a sua introdução nas Américas (2014), mais de 87 países já notificaram transmissão autóctone do ZIKV até julho de 2019, porém com uma queda substancial no número de casos desde a epidemia que ocorreu entre o final de 2015 e a primeira metade de 2016 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019; ZANLUCA et al., 2015) (Figura 2). Em 2018 foram notificados 31.587 novos casos de infecção por ZIKV nas Américas, dos quais 19.020 deles foram registrados no Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019). O Panamá e a Colômbia assumem o segundo e terceiro lugar no ranking com 2.752 e 1.736 casos suspeitos, respectivamente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

Figura 2- Distribuição geográfica do ZIKV



Fonte: Maucourant *et al.*, (2019, tradução da autora).

Legenda: O mapa representa a disseminação do ZIKV ao redor do globo, desde a sua descoberta em Uganda (1947), até as principais epidemias da febre do ZIKV, que ocorreram na Micronésia (2007), Polinésia Francesa (2013) e nas Américas (2013-2016).

Ainda no período epidêmico, e com toda atenção voltada para as Américas, alguns países do continente africano também apresentaram números importantes de novos casos de infecção com ZIKV, indicando a introdução da cepa asiática neste continente (OPAS/OMS, 2020). Um desses exemplos, são os 7.590 casos que ocorreram em Cabo Verde (2015-2016), além de casos de microcefalia e outras malformações congênitas em Angola e na Guiné-Bissau (2017) (OPAS/OMS, 2020). Já na Europa, grande parte dos casos estão relacionados a pessoas que viajaram para áreas endêmicas (MARTINET *et al.*, 2019; OPAS/OMS, 2020). Casos de transmissão autóctone do ZIKV são relatadas em diferentes regiões desse continente principalmente no período de atividade vetorial (maio a outubro), porém representam baixo a moderado risco de provocar epidemias (GIRON *et al.*, 2019; JUPILLE *et al.*, 2016; MARTINET *et al.*, 2019; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

Atualmente a história parece não mudar, com o Brasil permanecendo em primeiro lugar na notificação de casos de ZIKV em todo o mundo. De acordo com dados extraídos da OPAS/OMS, (2020), somente no ano de 2019 o Brasil notificou

28.482 casos, dos quais apenas 3.493 foram confirmados. Esse valor representa 84,02% dos casos confirmados em todo o Continente Americano, com números correspondentes a 33.896 e 6.640 de casos notificados e confirmados, respectivamente (OPAS/OMS, 2020). Em 2020, já são 7.143 casos relatados no Brasil, frente a 7.898 na América do Sul e 8.285 em todo o Continente Americano (OPAS/OMS, 2020). De acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, a região Nordeste apresenta o maior número de casos em território nacional (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (BRASIL), 2020a). Dentro desta região, os Estados com maiores taxas de incidência (número de casos/ 100 mil habitantes) são Bahia (10,6), Rio Grande do Norte (4,9) e Pernambuco (2,0) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (BRASIL), 2020a).

2.3 Dinâmica de Transmissão

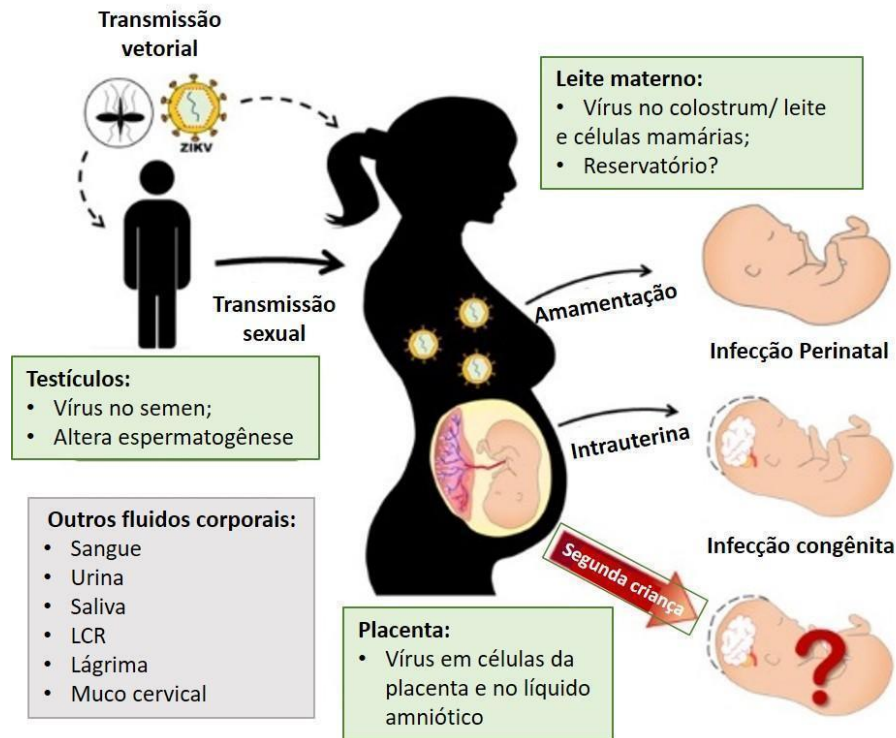
A transmissibilidade expressiva e epidemias recentes provocadas pelo ZIKV podem ser explicadas, ao menos em parte, pela ampla distribuição do mosquito vetor (*Aedes spp.*) nos centros urbanos (FARIA et al., 2017; MAGALHAES et al., 2018; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Este fenômeno ocorre devido a alterações climáticas, alta densidade populacional, aumento do número de viagens internacionais e urbanização, que interferem diretamente na sobrevivência do mosquito adulto, na replicação viral e nos períodos infecciosos (FARIA et al., 2017; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019; LIU-HELMERSSON et al., 2014; MAGALHAES et al., 2018; SAKKAS; ECONOMOU; PAPADOPOULOU, 2016). De acordo com Faria et al., (2017), para cada região brasileira existe uma forte associação entre o número de casos notificados semanalmente e a adaptação climática favorável à sobrevivência/ proliferação do mosquito vetor.

O *Aedes aegypti* é considerado o vetor principal, o que está relacionado a sua ótima adaptação e sobrevivência nas áreas urbanas (MUSSO; KO; BAUD, 2019). O *Aedes albopictus* por sua vez, é considerado um vetor secundário que apesar da sua distribuição em regiões com climas temperados, não apresenta grande relevância para a transmissão do ZIKV, no Brasil (JUPILLE et al., 2016; MARTINET et al., 2019; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Na Europa, esta espécie já apresenta um risco maior para o desencadeamento de epidemias, uma vez que é considerado um vetor efetivo do ZIKV, entre outros arbovírus, como DENV e CHIKV nesta região do

globo (GIRON et al., 2019; JUPILLE et al., 2016; MARTINET et al., 2019). De acordo com estudos, o *Culex quinquefasciatus* pode vir a ser um vetor da infecção, já que o ZIKV foi isolado tanto de mosquitos silvestres quanto infectados em laboratório (GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016; SMARTT et al., 2018).

Apesar da transmissão vetorial ser a principal via utilizada pelo ZIKV, outras rotas foram identificadas como porta de entrada para o vírus no organismo (MAGALHAES et al., 2018; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Estas compreendem as vias sexual, perinatal (no parto ou aleitamento materno) e transplacentária, como também a transfusão de sangue (BARJAS-CASTRO et al., 2016; MEAD; HILLS; BROOKS, 2018; MUSSO et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020). Hipóteses acerca da transmissão através do aleitamento materno e transplante de órgãos ainda não são confirmadas (NOGUEIRA et al., 2017; SAMPIERI; MONTERO, 2019). Em regiões não endêmicas, a transmissão sexual é considerada uma das principais vias para o contágio viral (CHEN; WILSON, 2016; SAKKAS; ECONOMOU; PAPADOPOULOU, 2016). Na Europa, Estados Unidos e Austrália, por exemplo, acredita-se que uma grande parcela dos indivíduos infectados, tenham sido expostos ao vírus através desta via (SAKKAS; ECONOMOU; PAPADOPOULOU, 2016). Já a transmissão materno-fetal, pode ocorrer em qualquer período gestacional causando sérias consequências para o desenvolvimento e saúde da criança (MUSSO; KO; BAUD, 2019) (Figura 3).

Figura 3- Vias de transmissão do ZIKV



Fonte: Teixeira *et al.*, (2020, tradução da autora).

Legenda: A figura retrata diferentes rotas de entrada do ZIKV no organismo. A transmissão vetorial ocorre pela picada da fêmea dos mosquitos do gênero *Aedes sp.*; Transmissão sexual devido a permanência do vírus no sêmen. Transmissão vertical, que pode ocorrer ainda em fase fetal (transmissão congênita), ou através da amamentação (transmissão perinatal). O ZIKV também foi detectado no sangue, urina, saliva, LCR, lágrima e muco cervical, porém informações acerca do potencial infeccioso destas partículas virais, ou da presença de um reservatório viral que possa influenciar no curso de uma segunda gestação, ainda não está esclarecido.

2.4 Infecção e imunidade: uma guerra sem vencedor?

Levando em consideração o modelo tradicional de transmissão, o vírus é inoculado na camada mais superficial da pele através da picada do mosquito vetor (HAMEL *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). A partir de então, acessa as camadas mais profundas, onde encontram-se queratinócitos, fibroblastos e Células Dendríticas (CD) (HAMEL *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). Além disso, estudos acerca da transmissão perinatal têm demonstrado que o vírus infecta células da barreira placentária, como sincitiotrofoblastos, trofoblastos, células endoteliais e macrófagos (AAGAARD *et al.*, 2017; KHAIBOULLINA *et al.*, 2019; QUICKE *et al.*, 2016). Em relação à transmissão sexual, o vírus já foi detectado em células de Sertolli e fibroblastos uterinos (CHEN *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2018a).

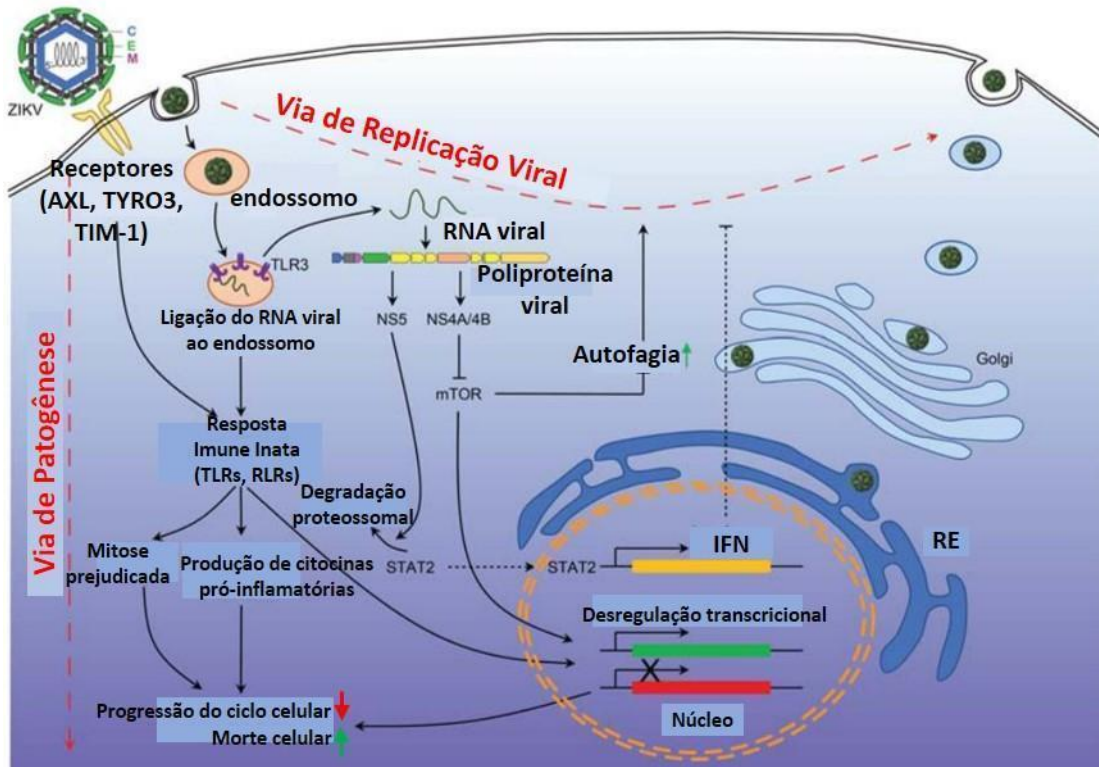
Independente da via, a infecção acontece através de endocitose mediada por receptor (BARROWS et al., 2018; HAMEL et al., 2015; WANG et al., 2017). Inicialmente, ocorre a ligação da proteína E disposta como dímeros na superfície viral a receptores específicos expressos na superfície das células-alvo – AXL (tem se mostrado o principal receptor para esta função), além de DC-SIGN, TIM-1 e TIM-4 –, já descritos como membros da família de receptores da fosfatidilserina (BARROWS et al., 2018; HAMEL et al., 2015; LIU et al., 2016). Esta ligação favorece a internalização do vírus e a formação do endossoma (BARROWS et al., 2018). No interior deste compartimento, as ATPases vacuolares, complexos protéicos de unidades múltiplas, acidificam o ambiente endossomal pelo bombeamento de prótons, permitindo a trimerização irreversível da proteína E com consequente fusão das membranas viral e do hospedeiro e, liberação do RNA viral para o citoplasma (BARROWS et al., 2018; WANG et al., 2017) (Figura 4).

Nesta etapa, o mRNA viral é traduzido pelos ribossomos associados à membrana do RE, seguido pelo processamento eficiente da poliproteína no lúmen do mesmo, gerando proteínas virais maduras que favorecem a formação de novos vírus infecciosos (BARROWS et al., 2018; SAGER et al., 2018). A presença de uma grande quantidade de proteínas não estruturais próximas ao RNA genômico, parece sinalizar a parada da tradução e o início da replicação (BARROWS et al., 2018). Esta, por sua vez, acontece pelo domínio RNA Polimerase Dependente de RNA (RdRp) da NS5, que usa o RNA senso positivo para a produção de uma fita de RNA negativo, que servirá de molde para a produção e replicação de novos RNAs senso positivo que constituirão o genoma das novas partículas virais (BARROWS et al., 2018) (Figura 4).

Os estágios finais do ciclo biológico do ZIKV, assim como de outros Flavivírus, ocorre pela montagem de partículas virais não-infecciosas, conhecidas como vírions, e da maturação e liberação dos vírus para o meio extracelular utilizando a via de secreção das células (BARROWS et al., 2018; SAGER et al., 2018). Os vírions são formados ainda no lúmen do RE e são constituídos pelo nucleocapsídeo e pelas proteínas prM e E (BARROWS et al., 2018). A maturação ocorre no *networking* trans-Golgi que por conter um pH ácido, promove rearranjos conformacionais na proteína E, a qual perde a estrutura trimérica e passa a ser dimérica, e a clivagem da prM em proteína de Membrana (M) e peptídeo pr (BARROWS et al., 2018; SAGER et al., 2018). Esse peptídeo impede a fusão viral

prematura, e somente é eliminado no processo de liberação das partículas virais infecciosas do meio intra para o meio extracelular, onde estão aptas a infectar novas células e repetirem o ciclo (BARROWS et al., 2018; SAGER et al., 2018) (Figura 4).

Figura 4- Ciclo biológico viral e patogênese



Fonte: Wen; Song; Ming, (2017, tradução da autora).

Legenda: A entrada do ZIKV na célula-alvo ocorre por endocitose mediada por receptor específico. A acidificação do endossomo favorece a liberação do RNA viral no citoplasma, onde é replicado e traduzido a uma poliproteína única. Esta, é processada em proteínas estruturais e não-estruturais que favorecem a formação, maturação e liberação de novos vírions utilizando a via de secreção das células. A infecção promove alterações no ciclo celular, ao passo que ativa a resposta imune antiviral do hospedeiro pela indução das vias do IFN-I (α/β).

Ao passo em que o ZIKV infecta e ativa a maquinaria celular em benefício próprio, o sistema imunológico responde de forma imediata com o objetivo de combater a infecção (BARROWS et al., 2018; HAMEL et al., 2015) (Figura 4). Nesse cenário, os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do Inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) específicos do ZIKV são identificados por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do Inglês, *Pattern Recognition Receptors*) endossomais e citosólicos, como *Toll Like Receptors* (TLRs 3 e 7), *Retinoic Acid-Inducible Gene-1 (RIG)-1-like Receptors* (RLRs) – RIG-1 e *Melanoma Differentiation Antigen 5* (MDA-5) – e GMP-AMP sintase cíclica (cGAS) (BARROWS

et al., 2018; HAMEL et al., 2015; NOORBAKHSH et al., 2019). A partir desta identificação, é iniciada uma resposta orquestrada pela ativação das vias de indução e de sinalização do IFN-I α/β , os quais são responsáveis pelo estabelecimento da imunidade antiviral (KIM et al., 2019; NOORBAKHSH et al., 2019) (Figura 4). Junto a via do IFN-I α/β , a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas também é iniciada, o que favorece uma atuação integrada das imunidades inata e adaptativa (celular e humoral), pelo recrutamento e ativação de células imunes, fosforilação de proteínas quinases, ativação do sistema complemento e liberação de mediadores inflamatórios (GARCIA et al., 2017; KIM et al., 2019; NOORBAKHSH et al., 2019; SCHIELA et al., 2018) (Figura 4).

2.5 Patogênese e manifestações clínicas

Essa batalha entre o vírus e o sistema imune é atualmente apontada como um dos fatores que podem influenciar na patogenia e evolução clínica da infecção. (MINER; DIAMOND, 2017). Posto isto, aproximadamente 80% dos pacientes são assintomáticos (BLÁZQUEZ; SAIZ, 2016; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Quanto aos outros 20%, a maioria deles apresenta uma doença leve e autolimitada caracterizada por febre, *rash* maculopapular, cefaleia, artralgia, mialgia, coceira e conjuntivite, sintomas esses que se estendem por no máximo 7 dias (BLÁZQUEZ; SAIZ, 2016; CHONG et al., 2019; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Enquanto isso, grupos populacionais específicos apresentam a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) ou SCZ, ambas relacionadas com o desenvolvimento de distúrbios neurológicos importantes em adultos ou crianças, respectivamente (BLÁZQUEZ; SAIZ, 2016; MUSSO; KO; BAUD, 2019).

2.5.1 ZIKV e condições neurológicas no adulto (SGB)

A associação da SGB e a infecção com ZIKV surgiu em 2013, porém, ganhou maior notoriedade após a inserção do vírus no Brasil (MUSSO; KO; BAUD, 2019; OEHLER et al., 2014). De acordo com um estudo baseado em modelo de meta-análise, sugere-se que 1,23% das pessoas infectadas com ZIKV, evoluam para um quadro de SGB (BARBI et al., 2018). Entre novembro de 2015 e janeiro de 2016, o Brasil notificou 1.708 casos da SGB representando um aumento de 19% na sua taxa

de incidência (BARBI et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2016). Somente no estado da Bahia, o aumento foi de 172% no número de casos (DOS SANTOS et al., 2016). A nível mundial, a chegada do vírus em outros países das Américas também elevou os números da SGB, com percentuais importantes na Colômbia (aumento de 211%), República Dominicana (150%), El Salvador (100%) e Venezuela (877%). Atualmente, acredita-se que a SGB atinja de 2 a 3 pessoas a cada 10.000 infectados com ZIKV (DOS SANTOS et al., 2016). Porém, sabe-se que outras condições neurológicas como, polineuropatia desmielinizante inflamatória, neuropatia axonal motora aguda e Síndrome de Miller-Fisher (subtipo da SGB) também podem estar associadas à infecção com este vírus (MUNÓZ; PARRA; PRADO, 2017).

Nos pacientes com ZIKV, os primeiros sintomas da SGB podem surgir durante 5 a 10 dias após as manifestações clínicas da febre do Zika (MUNÓZ; PARRA; PRADO, 2017). Segundo a literatura, esta é uma característica peculiar à infecção com ZIKV, visto que quando ocasionada por outros estímulos, a SGB apresenta-se somente a partir de 2 a 4 semanas após a doença antecedente (MUNÓZ; PARRA; PRADO, 2017; WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016). Conhecida como uma doença autoimune do Sistema Nervoso Periférico (SNP), é desencadeada após estimulações antigênicas provocadas por vacinas e infecções bacterianas e virais, que promovem a produção de autoanticorpos contra os gangliosídeos das células nervosas (BARBI et al., 2018; BLÁZQUEZ; SAIZ, 2016; LAUFER HALPIN et al., 2018). De acordo com Oehler et al., (2014), pode ser um resultado de infecções sequenciais com outros arbovírus, sugerindo um padrão parainfeccioso que levaria a exacerbação da resposta imune, quando associada à infecção com ZIKV. Quanto à clínica do paciente, esta caracteriza-se, principalmente, pela presença de paralisia progressiva (BARBI et al., 2018; BLÁZQUEZ; SAIZ, 2016). Os sintomas incluem fraqueza muscular, dificuldade de andar, paralisia facial e/ ou dificuldade respiratória, com possível evolução para quadros mais graves como incapacidade motora e respiratória significativas ou até mesmo a morte (BARBI et al., 2018; BLÁZQUEZ; SAIZ, 2016; LAUFER HALPIN et al., 2018; MUNÓZ; PARRA; PRADO, 2017).

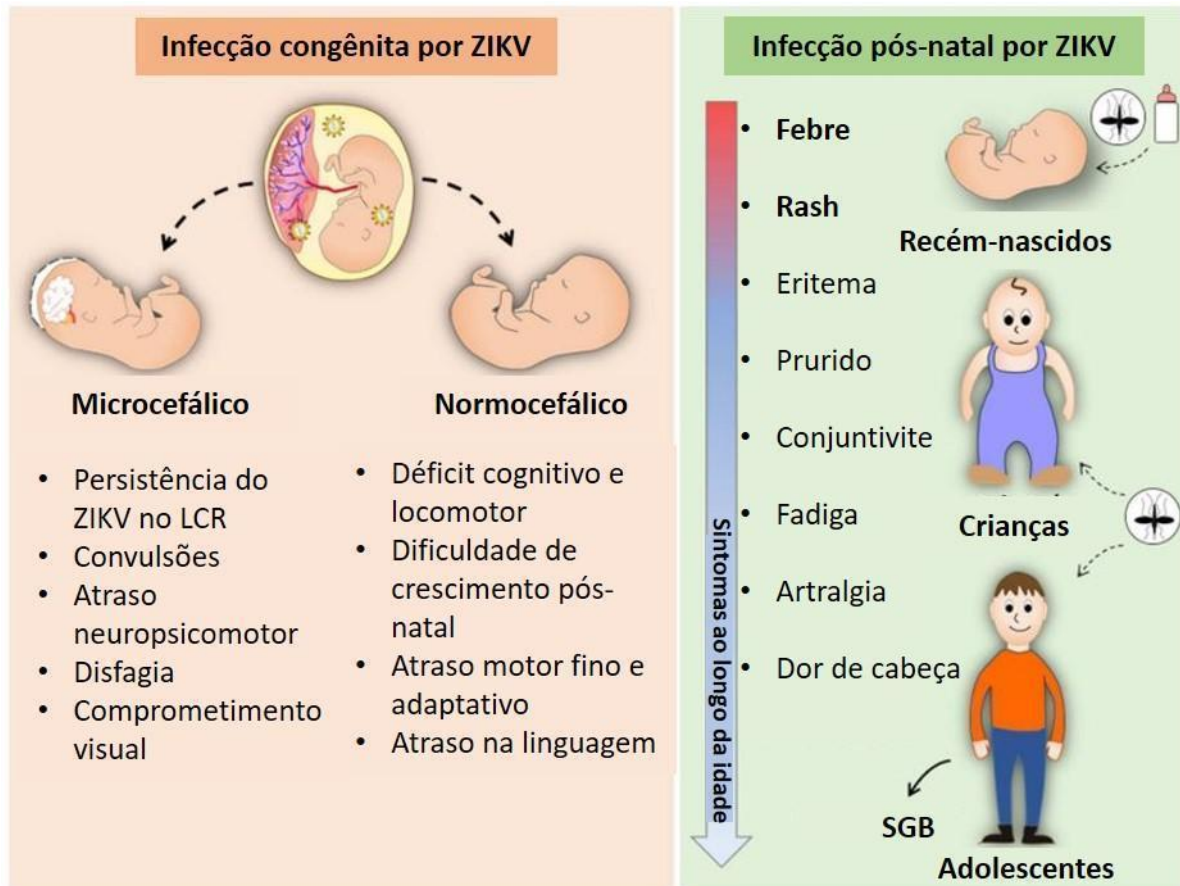
2.5.2 Síndrome Congênita do Zika: fato ou fake?

Desde a última epidemia que atingiu as Américas, as primeiras evidências de alterações neuronais congênitas associadas à infecção por ZIKV foram levantadas (BRITO, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2016; MARINHO et al., [s.d.]; DE ARAÚJO et al., 2018). Tal episódio ocorreu devido ao aumento nos casos de microcefalia em áreas com altas taxas de notificação de infecção por ZIKV (DE ARAÚJO et al., 2018; MARINHO et al., [s.d.]). A confirmação desta relação veio não só pela detecção de RNA viral e/ ou anticorpos IgM em amostras de tecido cerebral e líquido cefalorraquidiano (LCR) de recém-nascidos com microcefalia, mas também a partir de estudos que comprovaram a transmissão vertical e o tropismo do vírus por células placentárias e neuronais (AAGAARD et al., 2017; CORDEIRO et al., 2016; MARTINES et al., 2016; MINER; DIAMOND, 2017; TEIXEIRA et al., 2020).

A microcefalia é uma malformação congênita caracterizada pela redução significativa da circunferência occipitofrontal para valores $\leq 31,9$ cm e $\leq 31,5$ cm em meninos e meninas, respectivamente, com idade gestacional de 37 semanas ou mais (MARQUES et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020; WEN; SONG; MING, 2017). Além do período gestacional, essa condição pode se apresentar após o nascimento, provocando, em ambos os casos, alterações no neurodesenvolvimento da criança e déficit intelectual e motor, consequente à morte de células progenitoras corticais e neuronais e da neurogênese prejudicada (CUGOLA et al., 2016; FERRARIS et al., 2019; ROMBI et al., 2020; TANG et al., 2016; WEN; SONG; MING, 2017).

Inicialmente, pensava-se somente na microcefalia como efeito da infecção congênita por ZIKV, porém, à medida que a epidemia acontecia, mais estudos foram demonstrando a capacidade do vírus em promover uma pluralidade de alterações clínicas heterogêneas, mais tarde classificadas como SCZ (MARQUES et al., 2019; MUSSO; KO; BAUD, 2019; TEIXEIRA et al., 2020). Esta, por sua vez, é conhecida como um conjunto de malformações fetais e neurológicas graves, que compreende além da microcefalia, outras anomalias craniofaciais (calcificações cerebrais, hipoplasia cerebelar e do tronco encefálico, hidrocefalia, ventriculomegalia), hipoplasia pulmonar, restrição do crescimento fetal, artrogripose, comprometimento ocular (anormalidade do nervo óptico, atrofia coriorretinal, manchas focais na retina, catarata e estrabismo) e perda auditiva (LEAL et al., 2016; MARQUES et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020) (Figura 5).

Figura 5- Manifestações clínicas da SCZ



Fonte: Teixeira *et al.*, (2020, tradução da autora).

Legenda: Principais características clínicas da SCZ em diferentes etapas do desenvolvimento fetal e infantil. Microcefalia, outras anomalias craniofaciais, comprometimento motor, ocular e auditivo são algumas das malformações fetais e neurológicas graves desenvolvidas por crianças que foram expostas ao ZIKV ainda em idade fetal. Mesmo em RNs com perímetro cefálico normal, que tenham sido expostos ao vírus em idade fetal ou após o nascimento, podem apresentar atraso no desenvolvimento. A SGB é mais observada em adolescentes.

De acordo com estudos, a SCZ atinge uma média de 5 a 14% dos recém-nascidos expostos ao ZIKV durante o período gestacional (MUSSO; KO; BAUD, 2019). Dentro deste grupo, mais de 90% das crianças desenvolvem calcificações cerebrais e 39,7% delas apresentam microcefalia (MARQUES *et al.*, 2019). De acordo com levantamento feito por Marques *et al.*, (2019), o período gestacional em que a exposição ao vírus ocorre, influencia diretamente na condição clínica desenvolvida. Isso porque 100% das crianças expostas ao vírus no primeiro trimestre da gravidez apresentaram microcefalia, ao passo que a porcentagem de casos diminui quando a infecção ocorre no segundo e terceiro trimestres (MARQUES *et al.*, 2019). Além disso, 9% dos casos da SCZ ocorrem de forma tardia, podendo ser diagnosticada até o segundo ano de vida (MUSSO; KO; BAUD,

2019). Quanto à mortalidade associada à SCZ, esta pode chegar a marca de 7% durante a primeira semana de vida (MUSSO; KO; BAUD, 2019).

Estima-se que a SCZ tenha atingido um total de 757.703 crianças distribuídas em 26 países do Continente Americano no período epidêmico (2015-2016) (MARQUES et al., 2019). O Brasil e a Colômbia foram os países com maiores índices, representando um total de 1.608 e 1.415 (2016-2017) casos notificados, respectivamente (MARINHO et al., [s.d.]; MARQUES et al., 2019). No Brasil, a região Nordeste foi a primeira a associar a infecção por ZIKV com o desenvolvimento de quadros neurológicos e também a que apresentou o maior número de casos (MARINHO et al., [s.d.]; MARTINES et al., 2016). Dados obtidos do Boletim Epidemiológico liberado anualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil mostram que entre 2015 e 2020, de um total de 19.000 casos suspeitos da SCZ e outras etiologias infecciosas, 3.563 foram confirmados no país (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO (BRASIL), 2020c). Dentro do período acima mencionado, a mais alta prevalência de malformações congênitas foi observada no ano de 2016, com mais de 6.000 casos suspeitos e uma média de 2.700 confirmados (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO (BRASIL), 2020c). Nos anos posteriores, foi observada uma tendência de queda desses números, com 1.462 casos suspeitos e 72 casos confirmados, em 2019 (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO (BRASIL), 2020b). Já em 2020, dos 886 casos suspeitos, apenas 27 deles foram confirmados (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO (BRASIL), 2020c).

Apesar da queda substancial no número de casos, a SCZ ainda é um problema que se faz presente e exige atenção da comunidade científica para esclarecimento dos mecanismos patogênicos envolvidos, além da busca por alvos terapêuticos e estratégias vacinais eficientes para controle da disseminação viral (MUSSO; KO; BAUD, 2019).

2.6 Manejo clínico-laboratorial do paciente com ZIKV

Um dos grandes desafios da infecção com ZIKV é o manejo clínico-laboratorial do paciente infectado, principalmente em áreas onde há a co-circulação de outros Flavivírus, como o DENV por exemplo (SHARP et al., 2019). Isso ocorre porque ambos apresentam um quadro clínico similar que impossibilita o diagnóstico clínico, adicionado a alta reatividade cruzada no diagnóstico sorológico e a

inexistência de tratamento específico (MUSSO; KO; BAUD, 2019; QUANQUIN; WANG; CHENG, 2017; SHARP et al., 2019). De acordo com a literatura, a confirmação dos casos é baseada nos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (SHARP et al., 2019). O principal critério epidemiológico que deve ser levado em consideração, é se o paciente é residente ou tem histórico de viagem recente para áreas endêmicas (SHARP et al., 2019). Laboratorialmente, são aplicados testes moleculares e/ ou sorológicos escolhidos com base na fase da infecção em que o paciente se encontra (MUSSO; KO; BAUD, 2019; SHARP et al., 2019; WAGGONER; PINSKY, 2016).

Na fase virêmica, ou seja, nos primeiros setes dias após o início dos sintomas clínicos da infecção, os testes moleculares são preferíveis uma vez que baseiam-se na detecção do ácido nucléico viral e fornecem evidências conclusivas da infecção por ZIKV quando o resultado é positivo (GONCALVES et al., 2018; SHARP et al., 2019). A Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR, do Inglês, *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) é considerada o ensaio molecular padrão-ouro e por isso é amplamente utilizada pelos laboratórios de referência (DA SILVA; PARDEE; PENA, 2019; GONCALVES et al., 2018; SANTIAGO et al., 2018; WAGGONER; PINSKY, 2016). Além dela, alguns estudos têm obtido resultados promissores no uso de outros testes moleculares, como o de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP, do Inglês, *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (DA SILVA; PARDEE; PENA, 2019). Esta técnica garante alta especificidade e sensibilidade, porém é mais barata, mais rápida e de mais fácil interpretação que a RT-PCR (DA SILVA; PARDEE; PENA, 2019).

Ao final da primeira semana após o surgimento dos sintomas clínicos, entram em cena os testes sorológicos, que têm como objetivo a detecção de anticorpos de classe IgM (infecção recente) e IgG (infecção tardia) nos fluidos biológicos do paciente (SHARP et al., 2019; WAGGONER; PINSKY, 2016). O FDA indica a realização dos seguintes testes: Ensaio de Imunoabsorção em Placa (ELISA, do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e Ensaio de Neutralização por Redução em Placa (PRNT, do Inglês, *Plaque Reduction Neutralization Test*) (SHARP et al., 2019). No ELISA, resultados negativos excluem a suspeita de infecção com o vírus. Já os resultados positivos ou inconclusivos, precisam ser confirmados pela realização do PRNT, que por ser um ensaio quantitativo mede o título de anticorpos neutralizantes vírus-específico (SHARP et al., 2019). Ele é

importante porque ajuda a diminuir a taxa de resultados falso-positivos provocada pela alta reatividade cruzada entre os Flavivírus cocirculantes (SHARP et al., 2019).

Em relação ao tratamento, inúmeros esforços vêm sendo realizados na busca de medicamentos com ação antiviral frente ao ZIKV (BERNATCHEZ et al., 2020; DE CARVALHO et al., 2017; LIMA et al., 2020). De acordo com a literatura algumas moléculas têm demonstrado resultados positivos no combate à infecção, porém os testes são limitados a ensaios *in vitro* ou experimentação animal e ainda não evoluíram para pesquisas clínicas até o momento (BERNATCHEZ et al., 2020; DE CARVALHO et al., 2017; LIMA et al., 2020; QUANQUIN; WANG; CHENG, 2017). Na ausência de tratamento antiviral específico, a terapêutica é sintomática, geralmente baseada na administração de acetaminofeno para tratar dores e febre, como também anti-histamínicos, indicado para pacientes com prurido (QUANQUIN; WANG; CHENG, 2017). Nos pacientes com SGB associada à infecção com ZIKV a intervenção clínica é similar àquela observada nos pacientes que desenvolveram a síndrome em decorrência de outras estimulações antigênicas (QUANQUIN; WANG; CHENG, 2017). O tratamento inclui administração intravenosa de imunoglobulinas ou plasmaférese, além de ventilação mecânica em alguns casos (QUANQUIN; WANG; CHENG, 2017).

Quanto às gestantes, é indicado a realização de testes moleculares para pesquisa viral em amostras pareadas de soro e urina independente da presença ou ausência dos sintomas clínicos da infecção, isto quando residentes de áreas endêmicas (SHARP et al., 2019). Os exames sorológicos geralmente são recomendados quando a RT-PCR é negativa e a paciente for sintomática (MUSSO; KO; BAUD, 2019; SHARP et al., 2019). Caso a infecção por ZIKV seja confirmada, a paciente é encaminhada para a realização de exames de imagem constantes que visam a detecção precoce de possíveis alterações fetais (MUSSO; KO; BAUD, 2019). A amniocentese somente é indicada se o feto apresentar alterações nos exames de imagem. Uma vez diagnosticados com a SCZ, os recém-nascidos seguem com acompanhamento multidisciplinar que abrange desde avaliações neurológicas, oftalmológicas e do desenvolvimento, até a inclusão em programas de serviços de intervenção (ADEBANJO et al., 2017).

2.7 Mecanismos envolvidos na infecção congênita

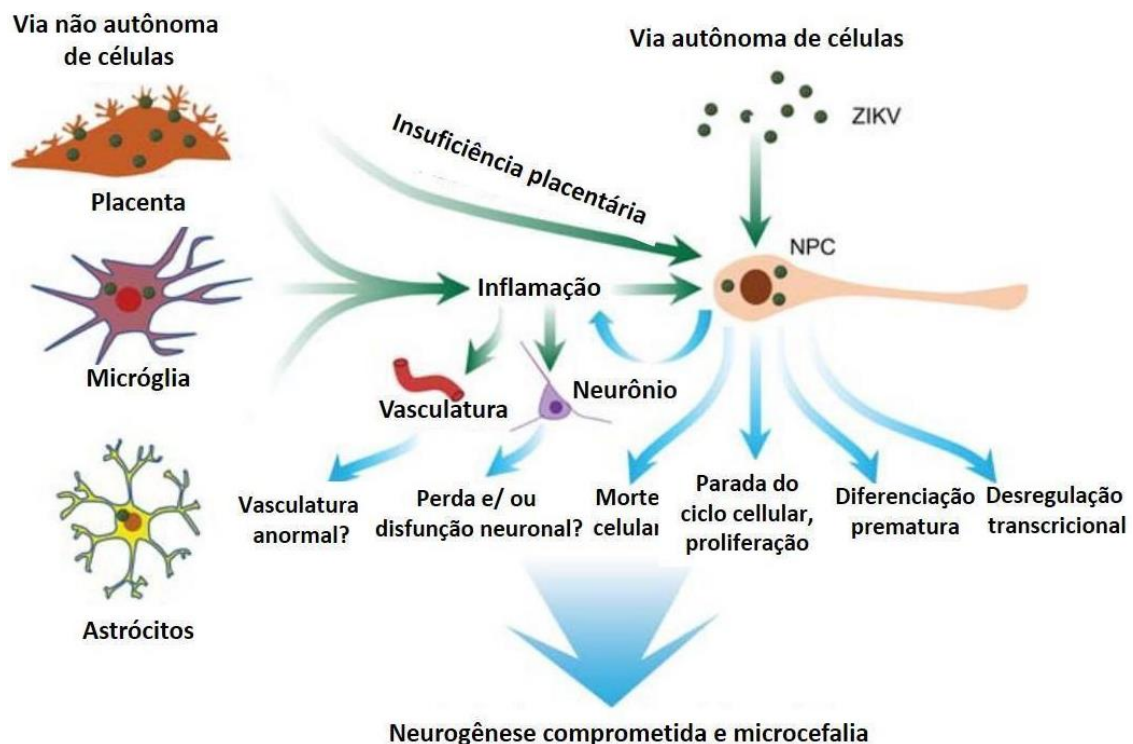
Uma das grandes apostas para o desenvolvimento da SCZ, baseia-se na resposta imune pós-infecção suportada por inflamação persistente no SNC e, no neurotropismo viral direto, principalmente devido a sua preferência por células progenitoras neuronais e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (ALIMONTI et al., 2018; FERRARIS et al., 2019; LIMA et al., 2019; MINER; DIAMOND, 2017; MUSSO; KO; BAUD, 2019; TANG et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2020). Dito isto, vale ressaltar que acredita-se numa causa multifatorial, influenciada por condições fisiológicas como o período gestacional, carência nutricional, mutações virais, fatores genéticos do hospedeiro e fatores ambientais (BARBEITO-ANDRÉS et al., 2020; CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; ROSSI et al., 2019; SCREATON; MONGKOLSAPAYA, 2017; YUAN et al., 2017). Porém, todos os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são bem compreendidos (TEIXEIRA et al., 2020).

O ZIKV parece acessar o SNC por infectar e cruzar a BHE através de mecanismos celulares básicos como endocitose, exocitose e transcitose (ALIMONTI et al., 2018; PAPA et al., 2017). Após entrada no SNC, uma das primeiras células infectadas são as micróglia que parecem contribuir para a disseminação do vírus por diferentes tecidos (DIOP et al., 2018a) (Figura 6). Imediatamente, o vírus acessa células neuronais e corticais (hiNPCs, neuroblastoma, neurônios maduros, astrócitos) em diferentes estágios de diferenciação e promove alterações no crescimento e desenvolvimento do SNC (LIMA et al., 2019; TANG et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2020; VAN DEN POL et al., 2017) (Figura 6).

Uma vez infectadas, as células sofrem uma desregulação do seu ciclo, caracterizada por inibição das vias de reparo do DNA, taxa de divisão celular diminuída, ativação de vias apoptóticas pela expressão de caspases 3, 7, 8 e 9, e, ativação de TLR3, que culmina na produção de CXCL-10/ IP-10, uma quimiocina com atividade pró-apoptótica (FERRARIS et al., 2019; GABRIEL et al., 2017; HAMMACK et al., 2019; LIMA et al., 2019; SÁNCHEZ-SAN et al., 2018; SOUZA et al., 2016; SUI et al., 2006; TANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016) (Figura 6). Além de CXCL-10/ IP-10, o vírus ativa a transcrição de diversos outros genes parcialmente dependentes da via do IFN e que atuam como proteínas essenciais ao funcionamento da resposta inflamatória, como por exemplo, proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs, do Inglês, *Mitogen-activated Protein Kinases*), transdutor de sinal e ativador do fator de transcrição (STAT, do Inglês, *Signal*

Transducer and Activator of Transcription Factor), CXCL-1 e -9 e interleucinas, além de genes relacionados às vias de neurogênese e de morte celular (DANG et al., 2016; LIMA et al., 2019). Estudos apontam ainda que a assinatura imune resultante da infecção com ZIKV é um processo cepa-dependente uma vez que a cepa africana e asiática ancestral (Camboja) promovem uma ativação mais robusta das vias pró-inflamatórias (LIMA et al., 2019; ÖSTERLUND et al., 2019). No caso das cepas Asiáticas contemporâneas (Brasil/ América, por exemplo) a resposta imune é mais sutil, porém persistente, favorecendo maior replicação viral (LIMA et al., 2019).

Figura 6- Neuropatogênese da infecção congênita por ZIKV



Fonte: Wen; Song; Ming, (2017, tradução da autora).

Legenda: A infecção de células neuronais e corticais (hiNPCs, neuroblastoma, neurônios maduros, astrócitos, microglia) por ZIKV, altera uma série de funções celulares. Transcrição de genes, diferenciação prematura, parada do ciclo celular, apoptose, inflamação e possíveis alterações vasculares, já foram identificadas. Juntos, esses mecanismos prejudicam a estrutura e funcionamento do SNC que está em fase de desenvolvimento, e por isso estão relacionadas à imunopatologia da SCZ.

Partindo da assertiva que a neuroinflamação é um processo caracterizado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios dentro do SNC e ser provocado por agentes infecciosos como vírus e bactérias, acredita-se que a persistência dessas moléculas no cérebro e medula espinhal fetal em formação, esteja em parte, relacionada com o desenvolvimento da SCZ (O'CALLAGHAN; MILLER, 2019;

RANSOHOFF; BROWN, 2012). Neste cenário, apesar da sua atividade central na ativação das respostas inflamatórias e de IFN contra o ZIKV, o TLR3 tem sido demonstrado como um possível potencializador da infecção congênita provocada pelo vírus (DANG et al., 2016). Dang et al., (2016), sugerem que a ativação desse PRR mediada pelo ZIKV, induziu alteração na transcrição de genes relacionados ao neurodesenvolvimento e ativação de proteínas com atividade anti-apoptóticas (DANG et al., 2016; OJHA et al., 2018). Além disso, eles observaram um aumento na replicação viral e redução no tamanho dos organoides cerebrais consequentes à sua ativação (DANG et al., 2016).

Altas concentrações de IFN- α no SNC podem levar a interferonopatias, caracterizada pela presença de alterações morfofisiológicas que abrangem calcificações cerebrais, alterações da substância branca e atrofia cerebral (GOUTIÈRES, 2005). Todas essas características clínicas, assim como uma exposição prolongada dos tecidos neurais fetais ao IFN-I já foram observadas em infantis com SCZ, sugerindo fortemente a participação dessa molécula para o estabelecimento das alterações congênitas provocadas pelo vírus (LIMA et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020). Parte destes dados foram mostrados em estudo do nosso grupo de pesquisa, realizado em amostras de LCR de recém-nascidos com microcefalia associada à infecção congênita com ZIKV *versus* recém-nascidos sem microcefalia e sem exposição prévia ao ZIKV ou outro arbovírus, o qual revela uma assinatura pró-inflamatória persistente no grupo acometido (LIMA et al., 2019). Da mesma forma, Camacho-Zavala et al., (2021), observou um perfil imune similar, agora em amostras de soro de gestantes infectadas com ZIKV, marcado predominantemente pela presença de CXCL-9/ MIG (do Inglês, *Monokine induced by gamma Interferon*), CXCL-10/ IP-10, CCL5/ RANTES (do Inglês, *CC Chemokine Ligand/ Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), IFN- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β .

O fato, é que além dos danos às células neurais, a presença desses mediadores inflamatórios na unidade neurovascular, geralmente está associada à alterações na permeabilidade da BHE (LEDA et al., 2019; LI et al., 2015; ROE; ORILLO; VERMA, 2014). Esta barreira, formada sobretudo por células endoteliais microvasculares, controla o fluxo de moléculas do sangue para o SNC, além de regular a resposta imune local, seja em condições fisiológicas ou patológicas (RANSOHOFF; BROWN, 2012). A interação ZIKV-BHE ainda gera muitas dúvidas

tanto acerca dos efeitos diretos do vírus nessas células, no que diz respeito a degradação das proteínas de junção celulares, remodelamento de actina, expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs, do Inglês, *Matrix Metalloproteinases*), entre outros, quanto na inflamação, a partir da regulação positiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF), aumento da expressão de moléculas de adesão celulares (MACs) – Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1, do Inglês, *Intercellular Adhesion Molecule 1*) e Molécula de Adesão Celular Vascular 1 (VCAM-1, do Inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) – e suas integrinas – antígeno 1 associado à função leucocitária (LFA-1, do inglês – *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1*) e antígeno 4 muito tardio (VLA4, do inglês – *Very Late Antigen 4*) – e migração de células imunes para os locais de injúria (ALIMONTI et al., 2018; LEDA et al., 2019; PAPA et al., 2017; PERSIDSKY et al., 2006). Pressupõe-se que todos esses mecanismos, juntos, possam gerar um ambiente tóxico que potencializaria os danos ao desenvolvimento neuronal e a morfofisiologia da própria BHE (DIOP et al., 2018; YOCKEY et al., 2018).

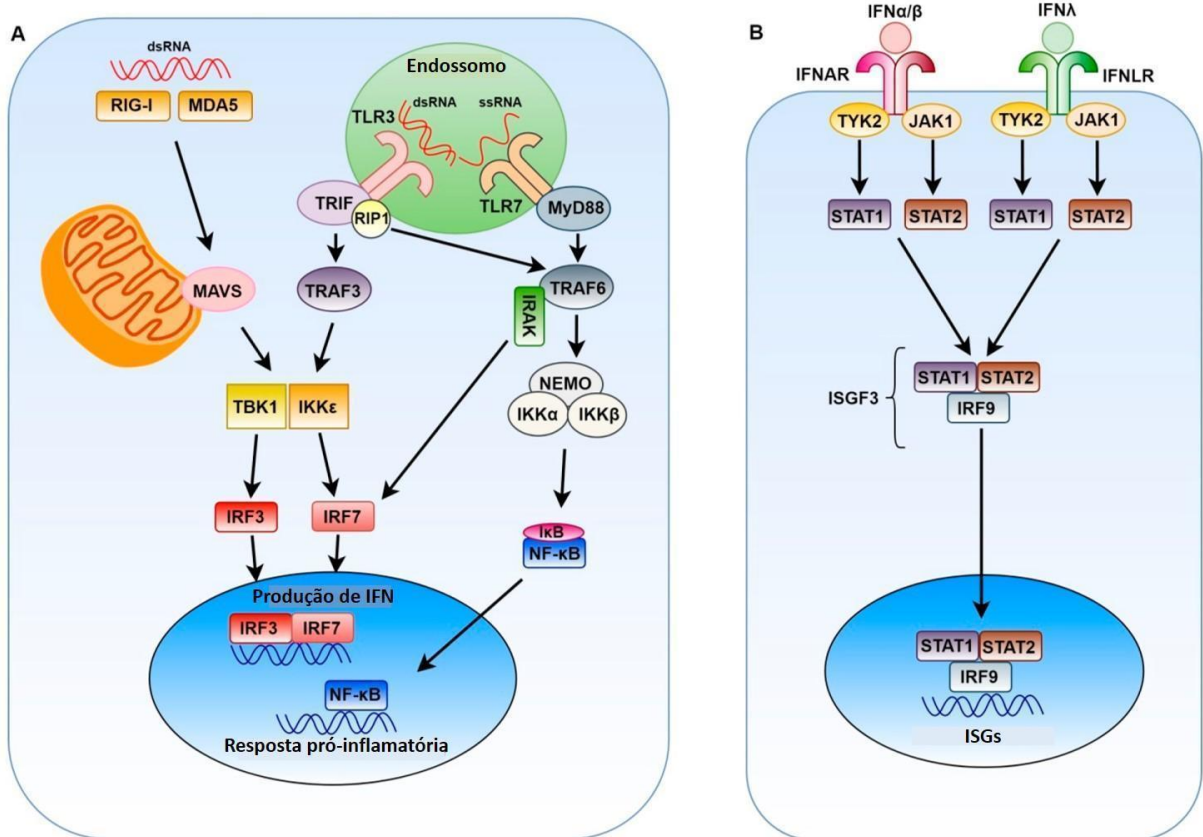
2.8 Via do IFN-I (α/β) e imunidade antiviral

A resposta imune inata desempenha papel fundamental no controle de infecções provocadas por Flavivírus (GARCIA et al., 2017; SCREATON; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA, 2018). Neste cenário, a ativação da via do IFN-I é crucial para que o estado antiviral seja estabelecido e ocorra a eliminação do patógeno (GARCIA et al., 2017; SCREATON; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA, 2018; SERMAN; GACK, 2019). Na infecção por ZIKV, diversos estudos já têm demonstrado em ensaios *in vitro* e *in vivo* que alterações nesta via acarreta efeitos nocivos à saúde da célula e do organismo (GRANT et al., 2016a; HAMEL et al., 2015; NGAN et al., 2019; WU et al., 2017; YOCKEY et al., 2018). Dentre estes, estão déficit na ativação dos genes estimulados por interferon (*Interferon Stimulated Genes*, ISGs) essenciais na amplificação da resposta imune antiviral e, efeitos virais diretos consequentes à replicação viral persistente (SERMAN; GACK, 2019).

Quando o ZIKV entra em contato com a célula-alvo, o sistema imune irá reconhecer os seus PAMPs por três mecanismos distintos: 1) Os TLRs 3 e 7, que reconhecem o RNA viral fita simples e dupla, e, induzem a translocação de proteínas adaptadoras, como Fator de Diferenciação Mielóide 88 (MyD88, do Inglês, *Adaptor*

Molecule Myeloid Differentiation 88), Proteína Adaptadora contendo o domínio TIR (TRIF, do Inglês, *TIR Domain-Containing Adaptor Inducing IFN β*) ou Molécula Adaptadora Relacionada a TRIF (TRAM, do Inglês, *TRIF-Related Adaptor Molecule*); 2) detecção de RNA dupla fita presente no citoplasma da célula por RLRs (RIG-1 e MDA-5), os quais induzem a formação de filamentos protéicos pela interação com a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS, do Inglês, *Mitochondrial Antiviral Signaling (MAVS) Protein*); e 3) os receptores cGAS que identificam DNA fita dupla “não-próprio” presente no citoplasma e no núcleo celular (GARCIA et al., 2017; SERMAN; GACK, 2019; SPARRER; GACK, 2015). Este, catalisa a síntese de GMP-AMP cíclico (cGAMP), que interage com o estimulador do gene IFN (*Stimulator of the Interferon Gene, STING*) (Figura 7).

A resposta induzida por estes receptores, converge na ativação de uma cascata de sinalização única baseada na fosforilação de proteínas quinases como, quinase 1 de ligação a TANK (TBK-1, do Inglês, *TANK-Binding Kinase 1*), MAPKs e quinase I κ B α e β (IKK α/β , do Inglês, *I κ B Kinase α e β*) (GARCIA et al., 2017; SERMAN; GACK, 2019; SPARRER; GACK, 2015). Após fosforilações sequenciais, estas quinases ativam os fatores reguladores de IFN (IRF, do Inglês, *Interferon Regulatory Factor*) 3 e 7, a proteína ativadora 1 (AP-1, do Inglês, *Activator Protein*) e fator nuclear- κ B (NF- κ B, do Inglês, *Nuclear Factor- κ B*), que levam a produção de IFN-I (α/β) e -III (λ), outras quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e genes estimulados por interferon (*Interferon Stimulated Genes, ISGs*) (GARCIA et al., 2017; SERMAN; GACK, 2019; SPARRER; GACK, 2015) (Figura 7).

Figura 7- Via de sinalização do IFN-I (α/β)

Fonte: Nelemans; Kikkert, (2019, tradução da autora).

Legenda: A) O reconhecimento dos PAMPs virais (RNA fita simples e dupla do ZIKV) por TLRs-3, -7 e -9, RIG-1 e MDA-5, induz a fosforilação de TBK-1, MAPKs e IKK α/β . Após fosforilações sequenciais, estas quinases ativam IRF 3 e 7, AP-1 e NF- κ B, o que resulta na produção de IFN-I (α/β) e -III (λ), e outras quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. B) Os IFNs produzidos, ligam-se aos seus receptores específicos (IFNAR) (ação autócrina e parácrina), ativam as vias de JAK-STAT e promovem a formação de um complexo protéico multimérico, conhecido como ISGF-3. Esse complexo transloca-se para o núcleo da célula, onde induz a expressão de ISGs e culmina na eliminação do patógeno e na regulação da resposta de IFN.

Os IFN-I (α/β) produzidos e secretados pelas células infectadas, agora desencadeiam uma segunda cascata de sinalização através da ligação com receptores de IFN-I (α/β) (IFNAR, do Inglês, *IFN-I α/β Receptors*) expressos por elas e por células vizinhas (ASIF et al., 2017; GRANT et al., 2016; SERMAN; GACK, 2019). Consequente a esta ligação, ocorre a ativação de outras proteínas quinases – Janus quinase (JAK, do Inglês, *Janus Kinase*) e tirosina quinase 2 (TYK2, do Inglês, *Tyrosine Kinase 2*) –, fosforilação e dimerização de STAT 1 e 2 e formação de um complexo protéico multimérico (STAT 1 e 2 + IRF 9), conhecido como Fator de Transcrição Estimulado por Interferon 3 (ISGF-3, do Inglês, *Interferon Stimulated Genes Factor 3*). Após formação, esse complexo transloca-se para o núcleo da célula, onde induz a expressão de ISGs pela ligação com os elementos de resposta

estimulados por IFN (*IFN-Stimulated Response Elements*, ISRE) (ASIF et al., 2017; GRANT et al., 2016a; SERMAN; GACK, 2019).

Os ISGs, por sua vez, compreendem tanto proteínas envolvidas na ativação do IFN, como por exemplo, PRRs, JAK2, STAT 1 e 2 e IRFs, como também proteínas pró-apoptóticas. Todos eles exercem múltiplas funções e atuam em diferentes fases do ciclo viral, ajudando na eliminação do patógeno e na regulação da resposta de IFN, através da regulação positiva de quimiocinas e seus receptores, como também, da comunicação célula a célula (GRANT et al., 2016; SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014; SERMAN; GACK, 2019) (Figura 7).

2.9 Evasão imune: mecanismos associados à supressão da via do IFN

Ao longo dos anos, os Flavivírus desenvolveram mecanismos diversos, capazes de evadir a resposta imune do hospedeiro (ASIF et al., 2017; GACK; DIAMOND, 2016; SERMAN; GACK, 2019; UBOL et al., 2010). Tais mecanismos estão relacionados com:

1. sequestro ou modificação do RNA viral pela formação dos compartimentos de replicação (vesículas citoplasmáticas que envolvem o RNA viral), utilizados pelo DENV e VNO impedindo o reconhecimento dele pelos RLRs citoplasmáticos, como também pela adição do cap-5' ao mRNA viral, pelo domínio MTase da NS5 (DAFFIS et al., 2010; GACK; DIAMOND, 2016; UCHIDA et al., 2014).
2. antagonismo direto e/ ou alteração subcelular dos PRRs, que ocorre por degradação direta de MAVS pelo conjunto NS3+NS4b do HCV, ou do complexo cGAS-STING pela protease NS2b3 do DENV (AGUIRRE et al., 2012; GACK; DIAMOND, 2016; LI et al., 2005; SERMAN; GACK, 2019). Adicionalmente, a ativação prejudicada de RIG-I pela NS3 do DENV e do VNO que impedem a oligomerização de RIG-I, e consequente translocação citoplasmática-mitocondrial e ligação à proteína adaptadora MAVS (GACK; DIAMOND, 2016; JIANG et al., 2012; SERMAN; GACK, 2019).
3. inibição de proteínas *downstream* na via do IFN-I, por impedir a fosforilação de proteínas quinases como IKK e TBK1, consequentemente

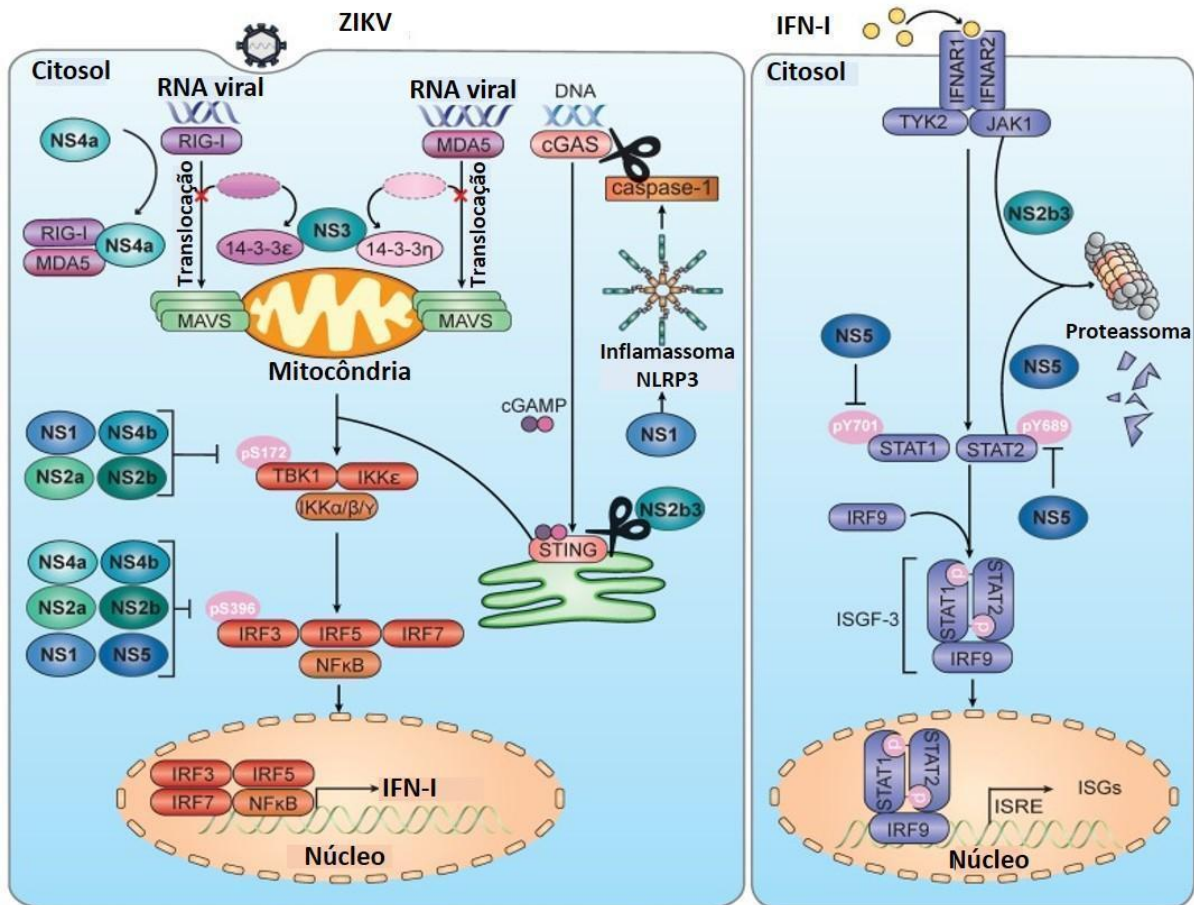
inibindo a ativação de IRFs (GACK; DIAMOND, 2016; SERMAN; GACK, 2019).

4. bloqueio da cascata de sinalização dependente de IFNAR, que pode ocorrer tanto pela inibição da atividade de JAK1 e TYK2, como pelo antagonismo de STAT 1 e 2, mediado tanto por proteínas estruturais (C e E), como por não estruturais (NS4B e NS5) (GACK; DIAMOND, 2016; SERMAN; GACK, 2019).

A evasão imune mediada por ZIKV acontece de forma muito parecida àquelas acima descritas (SERMAN; GACK, 2019). Um consenso já bem fundamentado, é o fato dessa supressão decorrer principalmente da atividade de proteínas virais não estruturais, que atuam tanto a nível de produção do IFN, quanto da cascata de sinalização do mesmo (ASIF et al., 2017; SERMAN; GACK, 2019). Um ponto significativo é a atuação dessas proteínas na resposta mediada por RIG-1 e MDA-5 (NGAN et al., 2019). Nesse contexto, a evasão está relacionada à regulação negativa destes receptores, impedimento da ligação com suas proteínas *scaffold*, ou da inibição de outras moléculas dependentes desta via de sinalização como, MAVS, TBK1, IRF3 e IKK, tudo isso mediado por NS2A, NS2B3, NS3 e NS4A (LI et al., 2019; NGAN et al., 2019).

Além destes, pode-se destacar: clivagem de cGAS um processo dependente de NS1 e da via NLRP3 do inflamassoma; clivagem ectópica e endógena do estimulador de genes de interferon (STING, do Inglês, *Stimulator of Interferon Genes*), este relacionado a NS2B3; degradação de JAK1 mediada por NS2B3 e de STAT por NS5; e a redução na ativação de ISRE, via NS4A (DING et al., 2018; GRANT et al., 2016; SERMAN; GACK, 2019; WU et al., 2017; ZHENG et al., 2018) (Figura 8). Diante do que foi dito, nota-se que a interação do ZIKV em diferentes pontos desta via, altera de forma ampla a resposta imune do hospedeiro, prejudicando não somente o mecanismo mediado pelo IFN propriamente dito, como também proteínas inflamatórias IFN-dependentes. Todo esse desarranjo imune contribui para disseminação viral e agravamento da infecção (SERMAN; GACK, 2019).

Figura 8- Infecção por ZIKV e mecanismos de evasão imun



Fonte: Serman; Gack, (2019, tradução da autora).

Legenda: O ZIKV evade a resposta imune antiviral principalmente pela regulação negativa de RIG-1 e MDA-5, que resulta na produção diminuída de IFN-I e de citocinas pró-inflamatórias. As proteínas NS2A, NS2B3, NS3 e NS4A impedem a ligação de RIG-1 e MDA-5 às suas proteínas *scaffold*, além de inibir a atividade de MAVS, TBK1, IRF3 e IKK. NS1 promove a clivagem de cGAS e da via NLRP3 do inflamassoma; NS2B3 induz a clivagem ectópica e endógena de STING e degradação de JAK1. NS4 reduz a ativação de ISRE, enquanto NS5 leva a degradação de STAT.

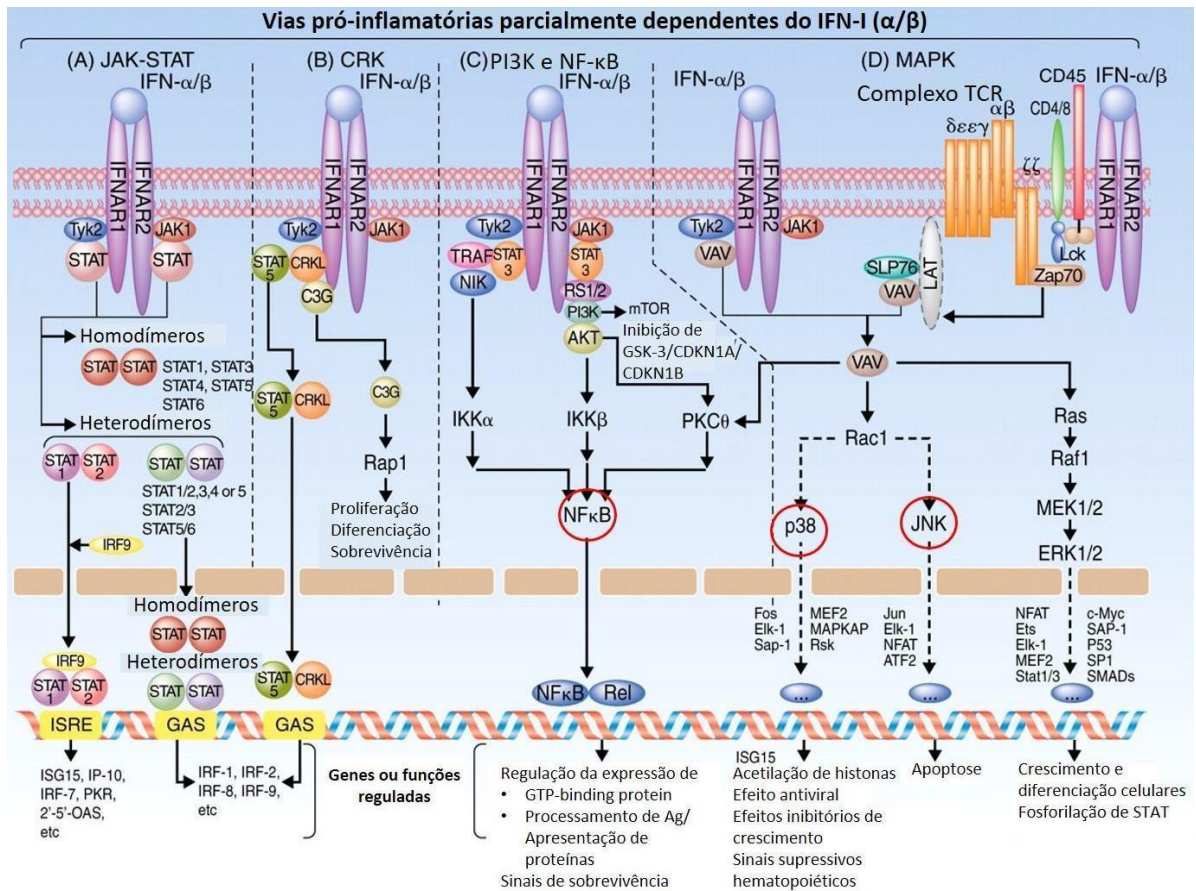
2.10 Inflamação: um mecanismo de defesa vital a saúde

Injúria e infecção, eis os dois principais, ou mais bem compreendidos eventos acerca da indução e execução de uma resposta inflamatória refinada no organismo (BARTON, 2008; MEDZHITOV, 2008). A inflamação é um dos mais importantes mecanismos utilizados pela resposta imune inata e, tem como função contribuir para eliminação de patógenos e promover o reparo tecidual (CHEN et al., 2018; MEDZHITOV, 2008). O processo requer a participação de uma variedade de células imunes e vasculares, e da produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas,

que trabalham de maneira integrada para restabelecer a homeostase do organismo (CHEN et al., 2018; MEDZHITOV, 2008; POBER; SESSA, 2007).

A ativação da resposta inflamatória é iniciada pela interação estímulo-receptor (BARTON, 2008; CHEN et al., 2018; HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021; MEDZHITOV, 2008). Os estímulos podem ser infecciosos, como é o caso dos PAMPs expressos por bactérias, vírus, ou outros patógenos, e não-infecciosos, que abrangem os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do Inglês, *Danger-Associated Molecular Patterns*) presentes em células mortas/ danificadas, compostos tóxicos, ou radiação (BARTON, 2008; CHEN et al., 2018; MEDZHITOV, 2008). Os estímulos são reconhecidos por diferentes PRRs, principalmente pelos da família dos TLRs e RLRs expressos tanto nas células residentes teciduais, como macrófagos, CDs e mastócitos, por exemplo, quanto por células imunes circulantes (BARTON, 2008; CHEN et al., 2018; MEDZHITOV, 2008; ZHENG et al., 2020). No caso do ZIKV, esse processo ocorre junto à ativação da via do IFN-I, através da interação Vírus-TLR-3, -7 e -9, Vírus-RIG-1/ MDA-5, como descrito previamente neste trabalho (SERMAN; GACK, 2019) (Figura 9).

Assim como nos processos inflamatórios gerais, a comunicação ZIKV-receptor favorece a ativação de MyD88, o que atua como um *start* para ativação das vias inflamatórias NF- κ B, MAPK e JAK/STAT (Figura 9). Uma vez ativadas, estas vias regulam a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (CHEN et al., 2018; SERMAN; GACK, 2019; ZHENG et al., 2020). Usualmente, o processo inicial é marcado pela produção de IL-1 β , IL-6 e TNF, que ao interagir com seus receptores específicos, atuam como um sistema de retroalimentação positivo, promovendo tanto a ativação e recrutamento de células imunes, como macrófagos e neutrófilos para os locais de injúria, quanto a regulação da cascata de quinases previamente ativada, que levam a produção de mais proteínas inflamatórias, e assim por diante (CHEN et al., 2018).

Figura 9- Vias pró-inflamatórias parcialmente dependentes do IFN-I (α/β)

Fonte: Hervas-Stubbs *et al.*, (2011, tradução da autora).

Legenda: A interação IFN-receptor induz a ativação das vias do NF- κ B, MAPK (p38 e JNK) e JAK/STAT. Estas são requeridas para a regulação de genes e funções celulares, como: produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, controle da proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular.

Diante da assertiva que diferentes estímulos geram perfis imunes distintos, a infecção com ZIKV parece desencadear uma resposta inflamatória bem ampla, caracterizada pela detecção de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, TNF, IFN- γ , CXCL-10/ IP-10, CCL5/ RANTES, proteína inflamatória de macrófagos 1 alpha (MIP-1 α , do Inglês, *Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha*) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do Inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), tanto em amostras clínicas de pacientes em fase aguda da infecção (soro, líquido amniótico e LCR), quanto nos sobrenadantes de linhagens celulares infectadas *in vitro* (LIMA *et al.*, 2019; MAUCOURANT *et al.*, 2019; ORNELAS *et al.*, 2017; TAPPE *et al.*, 2016).

Poucos minutos após o estímulo inicial já são suficientes para que a cascata de quinases seja ativada e as primeiras moléculas inflamatórias sejam produzidas,

porém, este é apenas o primeiro, de uma série de eventos celulares e moleculares altamente regulados (CHEN et al., 2018; MEDZHITOV, 2008; ZHENG et al., 2020). Um efeito da liberação dessas moléculas é a ativação do endotélio vascular, que vai auxiliar na regulação do processo inflamatório, através da liberação de mais mediadores químicos, promoção da quimiotaxia e rolagem de neutrófilos, e do extravasamento de plasma para os tecidos injuriados (MEDZHITOV, 2008; POBER; SESSA, 2007). Esses processos são favorecidos pelo aumento da permeabilidade vascular, como também da expressão de selectinas e de CAMs, que reconhecem integrinas e receptores de quimiocinas expressos na superfície dos neutrófilos, monócitos e de outras células imunes circulantes (MEDZHITOV, 2008; POBER; SESSA, 2007).

No tecido injuriado, a ação de citocinas secretadas localmente e/ ou por contato direto com patógenos, ativa os neutrófilos, que liberam grânulos tóxicos compostos por espécies reativas de oxigênio (ROS, do Inglês, *Reactive Oxygen Species*), óxido nítrico (NO, do Inglês, *Nitric Oxide*), proteinase 3, catepsina G e elastase5, que matam o agente infeccioso, mas também agridem os tecidos subjacentes (MEDZHITOV, 2008; POBER; SESSA, 2007). Por fim, a comunicação entre indutores, sensores, mediadores e efetores da inflamação, promovem o recrutamento e ativação de monócitos/ macrófagos, que fagocitam e destroem patógenos e restos celulares, além de promover o reparo do tecido danificado (CHEN et al., 2018; MEDZHITOV, 2008).

Clinicamente esse processo se caracteriza por dor, calor, rubor, edema e perda de função, e quando bem controlado, tende a desaparecer dentro de poucos dias (máximo de 6 semanas) (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021). Esta resposta imediata, de baixa especificidade, porém adaptável aos diferentes tipos de estímulos, é chamada de inflamação aguda (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021).

Mediante uma resposta falha, insuficiente para eliminar o patógeno e o reparo tecidual acontecer, o organismo busca outras alternativas para combater a infecção, através da migração de linfócitos T, células plasmáticas e acúmulo de macrófagos (CHEN et al., 2018; HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021; MEDZHITOV, 2008; POBER; SESSA, 2007). Mesmo com esse reforço, a resposta gerada pode ser incapaz de destruir o estímulo, que se torna contínuo, e então o estado inflamatório crônico se consolida (CHEN et al., 2018; HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021; MEDZHITOV, 2008; POBER; SESSA, 2007). A inflamação crônica, por sua vez,

envolve a formação de granulomas e tecidos linfóides terciários, e geralmente está relacionada à danos teciduais extensos, que podem ocorrer localmente (infecções e doenças autoimunes) ou de forma sistêmica (diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares) (CHEN et al., 2018; HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021; MEDZHITOV, 2008).

Salvo os casos de SGB, que merecem uma investigação mais aprofundada, a inflamação desencadeada pela infecção com ZIKV, não parece gerar grandes prejuízos à população adulta de forma geral (CAROD-ARTAL, 2018; TAPPE et al., 2016). Por outro lado, uma das grandes preocupações acerca do assunto, é a infecção de gestantes, já que o vírus atravessa a barreira transplacentária e consegue estabelecer o seu ciclo infeccioso no feto em desenvolvimento (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; FERRARIS et al., 2019; ORNELAS et al., 2017). De acordo com os dados atualmente apresentados pela literatura, cresce cada vez mais a suspeita de que a inflamação gerada nesses casos, atue como um fator iminente para o desenvolvimento da SCZ (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; DIOP et al., 2018; LIMA et al., 2019; QUICKE et al., 2016).

A infecção de diferentes linhagens neurais, as vias e moléculas que são ativadas nestas células após infecção, o perfil imune detectado em amostras de LCR de crianças com microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV, além da similaridade clínica com outras condições neurológicas que tem uma participação importante da inflamação para o seu estabelecimento, são apenas algumas das evidências que fundamentam essa ideia (AID et al., 2017; CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; DIOP et al., 2018; LEDA et al., 2019; LIMA et al., 2019; SÁNCHEZ-SAN et al., 2018). Diante da complexidade e da importância do assunto, o mesmo será abordado de forma mais refinada adiante neste trabalho.

2.10.1 Via do NF- κ B

O NF- κ B é um mediador central da resposta inflamatória no organismo e exerce papel crucial na resposta imune contra infecções virais (CHEN et al., 2018; LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020; LIU et al., 2017). Suas funções estão principalmente relacionadas a indução de genes pró-inflamatórios e a regulação dos mecanismos de sobrevivência, ativação e diferenciação de células imunes inatas e células T inflamatórias (CHEN et al., 2018; LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020; LIU et

al., 2017). O nome NF- κ B, representa um complexo proteico formado por cinco fatores de transcrição induzíveis e estruturalmente relacionados, conhecidos como NF- κ B-1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (P65), RelB e c-Rel (LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020; LIU et al., 2017). Sua ativação está relacionada a uma série de estímulos que irão se dividir entre duas vias de sinalização principais, a via canônica, que responde a praticamente todos os eventos que induzem a inflamação, e a via não-canônica/ou alternativa, a qual reconhece apenas grupos específicos de estímulos (LIU et al., 2017). Esta última, é vista como um braço auxiliar da via canônica e regula funções específicas da RIA (LIU et al., 2017; SUN, 2011). A translocação de NF- κ B por ela mediada, depende da atividade da proteína quinase indutora de NF- κ B (NIK, do Inglês, *NF- κ B-Inducing Kinase*), seguida da fosforilação e processamento de proteínas *like* I κ B, p105 e p100 (LIU et al., 2017; SUN, 2011).

A interação antígeno-PRRs (ZIKV/ TLRs/RLRs, LPS/ TLRs), citocina-receptor de citocina (IL-1B/ IL-1BR, TNF/ TNFR), antígeno-MCH, por exemplo, já são suficientes para que a via canônica de sinalização do NF- κ B seja iniciada (CHEN et al., 2018; LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020; LIU et al., 2017). Esses estímulos, irão resultar na fosforilação de proteínas IKK e degradação de I κ B, uma proteína inibitória que retém o NF- κ B no citoplasma, sob condições fisiológicas (CHEN et al., 2018; LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020; LIU et al., 2017; SUN, 2011). As proteínas IKK são compostas por duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , e uma subunidade conhecida como modulador essencial de NF- κ B (NEMO, do Inglês – *NF- κ B essential modulator*) ou IKK γ , de função reguladora (SUN, 2011). Uma vez fosforiladas, as proteínas IKK, especialmente sua subunidade IKK β , degradam I κ B α , favorecendo a translocação das porções canônicas do NF- κ B (dímeros de p50/RelA(p65) e p50/c-Rel) para o núcleo, onde interagem com regiões específicas do DNA e ativam a transcrição de genes pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celulares, MMPs), genes relacionados a via do IFN, genes pró- e anti-apoptóticos, entre outros (CHEN et al., 2018; LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020; LIU et al., 2017; SUN, 2011).

As proteínas aqui produzidas irão conduzir uma cascata de eventos imunes essenciais à recuperação da homeostase no organismo, enquanto que uma desregulação desta via pode levar ao surgimento de câncer, doenças inflamatórias crônicas e infecções persistentes (LEE; NGUYEN; MYOUNG, 2020). De acordo com estudo realizado por Lee, Nguyen e Myoung, 2020, tanto proteínas estruturais (C,

prM e E), quanto as proteínas não-estruturais NS2A, NS2B, NS3 e NS4A do ZIKV, reduzem a atividade de NF-Kb, através da interação com os receptores RIG-1 e MDA-5 e pela inativação ou regulação negativa de proteínas de sinalização desta via, como TBK-1, IRF3, IKK e da forma ativa de RIG-1 (RIG-I-1-228). A inibição desses fatores, interfere não somente na via do NF-κB, mas principalmente na produção de IFNs, citocinas centrais no estabelecimento da imunidade antiviral capaz de eliminar a infecção (LUNDBERG et al., 2019).

2.10.2 Via de sinalização MAPK

As vias de quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ ERK, do Inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase/ Extracellular Signal-Regulated Kinase*), c-Jun N-terminal quinase/ proteína quinase ativada por estresse (JNK/SPK, do Inglês, *c-Jun N-terminal Kinase/ Stress-Activated Protein Kinase*) e MAPK p38, são as mais bem caracterizadas vias de sinalização que formam a família de MAPKs (KUMAR et al., 2018b; SOARES-SILVA et al., 2016; ZHANG; LIU, 2002). Recebem essa classificação de acordo com as similaridades nas sequências de aminoácidos e dos modos de ativação (KUMAR et al., 2018b; SOARES-SILVA et al., 2016; ZHANG; LIU, 2002). Tratam-se de vias evolutivamente conservadas em eucariotos, que auxiliam na transmissão, amplificação e integração de sinais envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação e transformação celulares, além de atuarem como reguladoras da inflamação e da apoptose (KUMAR et al., 2018b; SOARES-SILVA et al., 2016; ZHANG; LIU, 2002).

Diferente da via MAPK/ERK, ativada quase que exclusivamente por fatores de crescimento e hormônios, as vias p38 e JNK/SPK, respondem a uma variedade de fatores ambientais e celulares (estresse), que incluem infecções (inclusive virais), radiação UV, choque térmico, alterações osmolares, LPS, ROS, drogas citotóxicas e certos mitógenos (CHENG et al., 2018; KUMAR et al., 2018b; ZHANG; LIU, 2002; ZHU et al., 2017). É importante salientar que estímulos pró-inflamatórios ativam todas essas vias, o que resulta na produção de citocinas imunomoduladoras, como TNF, IL-1, IL-10 e IL-12, que irão auxiliar não somente no controle da resposta imune, mas também em todos os outros processos dependentes da atividade da via MAPK (KUMAR et al., 2018b; ZHANG; LIU, 2002; ZHU et al., 2017). Em decorrência do estímulo inicial, proteínas MAPKs efetoras são ativadas a partir de fosforilações

consecutivas dos seus próprios resíduos de serina e treonina, de modo que MAPK quinase quinase (MAPKKK, do Inglês, *MAPK Kinase Kinase*) fosforila MAPK quinase (MAPKK, do Inglês, *MAPK Kinase*), que então fosforila MAPK (CHEN et al., 2018; KUMAR et al., 2018b; SOARES-SILVA et al., 2016). Além da autofosforilação, várias proteínas como p53 e AP-1, por exemplo, também tem seus resíduos serina/treonina fosforilados pelas MAPKs, resultando na conversão de sinais extracelulares (estímulos) em uma infinidade de atividades celulares (inflamação, apoptose, diferenciação celular, entre outras) (CHEN et al., 2018; KUMAR et al., 2018b; ZHANG; LIU, 2002).

Neste aspecto (estímulo-resposta celular), podemos ressaltar as infecções virais (vírus vivo ou inativado) e a resposta imune por elas mediadas, como dois dos principais fatores que ativam a via de MAPK (KUMAR et al., 2018b). Como relatado anteriormente, MAPK é uma das principais vias inflamatórias ativadas em detrimento do reconhecimento de PAMPs virais, incluindo o ZIKV, pelos PRRs (SCREATON; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA, 2018). Essa via está associada com a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, que irão regular a cascata imune previamente ativada, diversas fases do ciclo replicativo viral e a apoptose (KUMAR et al., 2018b; MUTHURAJ et al., 2021; ZHU et al., 2017). De acordo com Andrade et al., 2004, algumas proteínas secretórias virais por si só, são capazes de induzir a via MAPK constantemente. Além disso, a interação do vírus com membros das vias MAPK/ERK, JNK/SPK e p38, pode favorecer ou prejudicar a replicação dos mesmos e, conseqüentemente aumentar ou eliminar a infecção (CHOWDHURY et al., 2020; RODRÍGUEZ et al., 2014). De acordo com a literatura, à infecção com ZIKV leva à ativação das vias MAPK/ERK, JNK/ SPK e p38, o que parece reduzir ou até mesmo inibir a replicação viral em linhagens celulares humanas e de mosquitos, além de induzirem uma assinatura imune pró-inflamatória e apoptose (CHOWDHURY et al., 2020; MUTHURAJ et al., 2021; ZHU et al., 2017).

2.10.2.1 Via MAPK p38

A via de MAPK p38 é bastante estudada nas infecções virais, uma vez que é um componente necessário à sinalização dos IFNs (KUMAR et al., 2018b; ZHANG; LIU, 2002). Quando ativadas, essas proteínas direcionam a fosforilação de STAT1,

essencial a transcrição de ISGs, os quais induzem processos celulares responsáveis pelo clearance viral (GOH; HAQUE; WILLIAMS, 1999; SERMAN; GACK, 2019; ZHANG; LIU, 2002). Além disso, promovem a fosforilação de fosfolipase A2 citosólica, responsável pela hidrólise do ácido araquidônico, um substrato essencial para a síntese de mediadores inflamatórios importantes, a exemplo das cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), produzidos principalmente por neutrófilos, macrófagos e mastócitos (LESLIE, 2015; ZHANG; LIU, 2002).

São conhecidas 4 isoformas de p38, identificadas como p38 α – a mais bem caracterizada de todas elas –, p38 β , p38 γ e p38 δ , que são ativadas por MAPK quinase MKK6 (SKK3) e MKK3, principais proteínas efetoras desta via (KUMAR et al., 2018b; ZHANG; LIU, 2002). Dentre suas funções, podemos citar a participação nos processos apoptóticos e inflamatórios (KUMAR et al., 2018b; ZHANG; LIU, 2002; ZHU et al., 2017). No primeiro, pode promover parada do ciclo celular na fase G1/S (ZHANG; LIU, 2002). Quanto a inflamação, regulam a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, TNF, IL-1B, e de quimiocinas, por exemplo CXCL-10/ IP-10, CXCL-9/ MIG, CCL5/ RANTES, que irão mediar as respostas imune inata e adaptativa, como por exemplo aumento da expressão de MACs (ICAM-1, VCAM-1), integrinas, recrutamento de células imunes, diferenciação de células T e expressão de MMPs, frente a diferentes estímulos, inclusive nas infecções virais (KUMAR et al., 2018b; PAPA et al., 2017; ZHU et al., 2017).

2.10.2.2 Via de transdução de sinal JNK (c-Jun)

As proteínas JNK são codificadas por três genes distintos conhecidos como *JNK1*, *JNK2* – presentes em todas as células do organismo – e *JNK3* – exclusivo do cérebro, coração e testículos – (CORRALES; LOSADA-PÉREZ; CASAS-TINTÓ, 2021; KUMAR et al., 2018b). Sua ativação, deve-se pela atividade de MKK4 e MKK7, que fosforilam proteínas citosólicas e nucleares envolvidas em diversos processos celulares, como inflamação, apoptose, desenvolvimento embrionário, regulação de células do SNC sob condições fisiológicas e patológicas, sobrevivência celular, entre outros (CORRALES; LOSADA-PÉREZ; CASAS-TINTÓ, 2021; WESTON; DAVIS, 2007). Uma proteína importante desta via, é c-JUN, que quando fosforilada, ativa o fator de transcrição de AP-1, que regula negativamente genes anti-apoptóticos como *bcl2*, *bcl-xl* e *Mcl-1*, enquanto regula positivamente genes pró-

apoptóticos que pertencem a família *bcl-2* (WESTON; DAVIS, 2007; ZHANG; LIU, 2002). Um segundo mecanismo apoptótico associado à ativação de JNK, é a via de estresse do retículo endoplasmático (RE), mediado pela ativação de CHOP, que também resulta na expressão diminuída de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, demonstrado por Muthuraj et al., (2021), em trofoblastos infectados com ZIKV. Juntos, estes dados destacam a importância da ativação de JNK nas infecções virais.

2.11 Neuroinflamação: uma *thread* comum das infecções virais

O SNC é um sistema de privilégio imune (CARSON et al., 2006; FORRESTER; MCMENAMIN; DANDO, 2018). Tal afirmação é explicada devido a sua capacidade de atenuar os possíveis efeitos deletérios decorrentes da ativação imune que ocorre no cérebro e medula espinhal (FORRESTER; MCMENAMIN; DANDO, 2018). Esse fenômeno ocorre pela presença de barreiras físicas, fisiológicas e imunológicas próprias, que controlam a passagem de agentes infecciosos, células imunes, e outras moléculas da periferia para a cavidade neurovascular, além de regularem a resposta imune adaptativa e a inflamação (CARSON et al., 2006; FORRESTER; MCMENAMIN; DANDO, 2018). O SI do SNC é formado por células imunes locais, como glia (células microgliais e astrócitos), células imunes periféricas, a exemplo dos macrófagos, neutrófilos e células T e B, células endoteliais microvasculares cerebrais (BMVECs, do Inglês, *Brain Microvascular Endothelial Cells*) e pelos próprios neurônios (GILHUS; DEUSCHL, 2019).

Um dos eventos imunes mais bem estudados dentro do SNC é a neuroinflamação (GILHUS; DEUSCHL, 2019; KLEIN et al., 2019; O'CALLAGHAN; MILLER, 2019). Por definição, caracteriza-se como uma resposta inflamatória que acontece no encéfalo, meninges e/ ou na medula espinhal (GILHUS; DEUSCHL, 2019; SHABAB et al., 2017). É ativada por uma variedade de estímulos, como infecções virais e bacterianas, doenças neurodegenerativas, injúria e trauma, e, mediada pela produção de citocinas, quimiocinas, ROS, eicosanóides e prostaglandinas, produzidas pelas células anteriormente citadas (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; LI et al., 2015; O'CALLAGHAN; MILLER, 2019). Trata-se de um processo refinado, que visa restaurar a homeostase no SNC, sem prejudicar

as estruturas e funcionalidades do mesmo (KLEIN et al., 2019). Nesse ambiente, a resposta inflamatória pode ocorrer em diferentes graus e tem influência do tipo de estímulo, do curso e do tempo de duração da resposta (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). Porém, é frequentemente relatada pela literatura, como um evento negativo, uma vez que a linha entre a regulação e desregulação neuro imune é muito tênue, e pode causar efeitos deletérios graves, muitas vezes permanentes (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GILHUS; DEUSCHL, 2019; SHABAB et al., 2017).

As células microgliais, também conhecidas como macrófagos residentes do SNC, constituem a primeira linha de defesa contra os vírus neurotrópicos e uma variedade de outros estímulos (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GILHUS; DEUSCHL, 2019). Produzidas a partir de precursores mieloides na medula óssea, migram para o cérebro entre o oitavo e nono dia do período embrionário, antes mesmo dos neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; TONG; VIDYADARAN, 2016). Suas funções, não se limitam às atividades de células de defesa, mas também à contribuição para a sobrevivência desse sistema, por regular a homeostase, fagocitar células progenitoras neurais que entraram em apoptose, fornecer suporte trófico para os neurônios e regular o desenvolvimento das sinapses (TONG; VIDYADARAN, 2016). Através do reconhecimento antigênico mediado via receptores específicos expressos em sua superfície – que pode ocorrer pela ação direta dos PAMPs virais e/ ou dos IFNs e citocinas secretadas por células neuronais previamente infectadas –, integram a comunicação entre SNC e sistema imune periférico (SNP) pela produção de mais citocinas e quimiocinas, e consequente propagação de sinais inflamatórios (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GILHUS; DEUSCHL, 2019; KLEIN et al., 2019).

Concomitantemente, astrócitos e HBMECs são ativados e regulam positivamente a expressão de moléculas e receptores quimioatraentes, como CCL2/ MCP-1 (do Inglês, *CC Chemokine Ligand/ Monocyte Chemoattractante Protein 1*), CCL3, CCL5/ RANTES, ICAM-1 e VCAM-1, que facilitam a migração de células imunes periféricas para a unidade neurovascular (KLEIN et al., 2019). Adicionalmente, os astrócitos regulam a integridade da BHE e ativação da resposta imune adaptativa, por influenciar na expressão de MHC classe I e II, e promoverem um fenômeno conhecido como astrogliose, favorecido pela produção de IL-1, IL-6,

TNF and IFN- γ (KLEIN et al., 2019). Um ponto em comum entre todas essas células é a expressão de TLR3, TLR7, RIG1 e MDA5, que irão mediar todo esse processo de ativação da cascata de IFNs e de vias inflamatórias relevantes (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GILHUS; DEUSCHL, 2019; KLEIN et al., 2019).

Os vírus neurotrópicos, assim denominados por serem capazes de infectar células da unidade neurovascular, estão entre os principais mediadores da neuroinflamação (KLEIN et al., 2019; LIMA et al., 2019; NIRANJAN; MUTHUKUMARAVEL; JAMBULINGAM, 2019). Geralmente, a infecção por esses patógenos tem início sistêmico e somente depois acessam o SNC utilizando uma variedade de rotas (GILHUS; DEUSCHL, 2019; LUDLOW et al., 2016). Dentre elas, podem-se destacar: disseminação hematogênica através da BHE, barreira sangue-LCR, barreira meníngea-LCR, infecção direta de células endoteliais, ou via disseminação de leucócitos infectados através da BHE no parênquima cerebral (LUDLOW et al., 2016). Este último, um fenômeno também conhecido como Cavalo de Tróia, é bem caracterizado nas infecções com o JEV (HSIEH; JOHN, 2020). No caso das infecções congênitas por ZIKV, a barreira transplacentária é utilizada para chegar à circulação fetal, e então alcançar a unidade neurovascular provavelmente pela infecção de HBMECs, como também da passagem do vírus e de células imunes periféricas infectadas pelos espaços intercelulares (ALIMONTI et al., 2018; MUSSO; KO; BAUD, 2019; PAPA et al., 2017).

A ação direta dos vírus, assim como a resposta imune por ele desencadeada, pode perturbar irreversivelmente a complexa arquitetura estrutural e funcional do SNC, causando uma série de doenças (KLEIN et al., 2019; LUDLOW et al., 2016). Encefalopatia aguda, meningoencefalite, síndrome da doença neurológica, são condições clínicas frequentemente observadas nas infecções por JEV, VNO e Vírus Herpes Simplex (HSV) em adultos (BIAN et al., 2020; SHIVES; TYLER; BECKHAM, 2017; LI et al., 2015; ROE et al., 2012; ROE; ORILLO; VERMA, 2014). Mais recentemente, quadros de encefalomielite disseminada aguda, desconforto respiratório mediado pelo SNC e perda de consciência, foram confirmados em pacientes infectados com SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (SHARIFIAN-DORCHE et al., 2020).

Nas infecções congênitas, podemos citar o vírus do sarampo, HSV, e principalmente o ZIKV, que promoveu uma epidemia de microcefalia no Brasil (FERNANDES; ARYA; WARD, 2021; GEORGE; VISWANATHAN; SAPKAL, 2019;

KAZMI et al., 2020). É importante citar que as alterações neurológicas decorrentes da infecção com estes vírus, são influenciadas pelo tipo de vírus, pelo seu ciclo replicativo (rota de entrada – células-alvo), fatores genéticos do hospedeiro e da resposta imune (KLEIN et al., 2019). Um dos pontos que chama bastante à atenção, é que a resposta pró-inflamatória em todos esses casos é muito marcante, caracterizada por uma exacerbação na regulação positiva de células e de mediadores pró-inflamatórios, ou na ativação constante dos mesmos, o que caracterizaria uma inflamação crônica (BIAN et al., 2020; KHAIBOULLINA et al., 2019; LI et al., 2015; LIMA et al., 2019; ROE; ORILLO; VERMA, 2014).

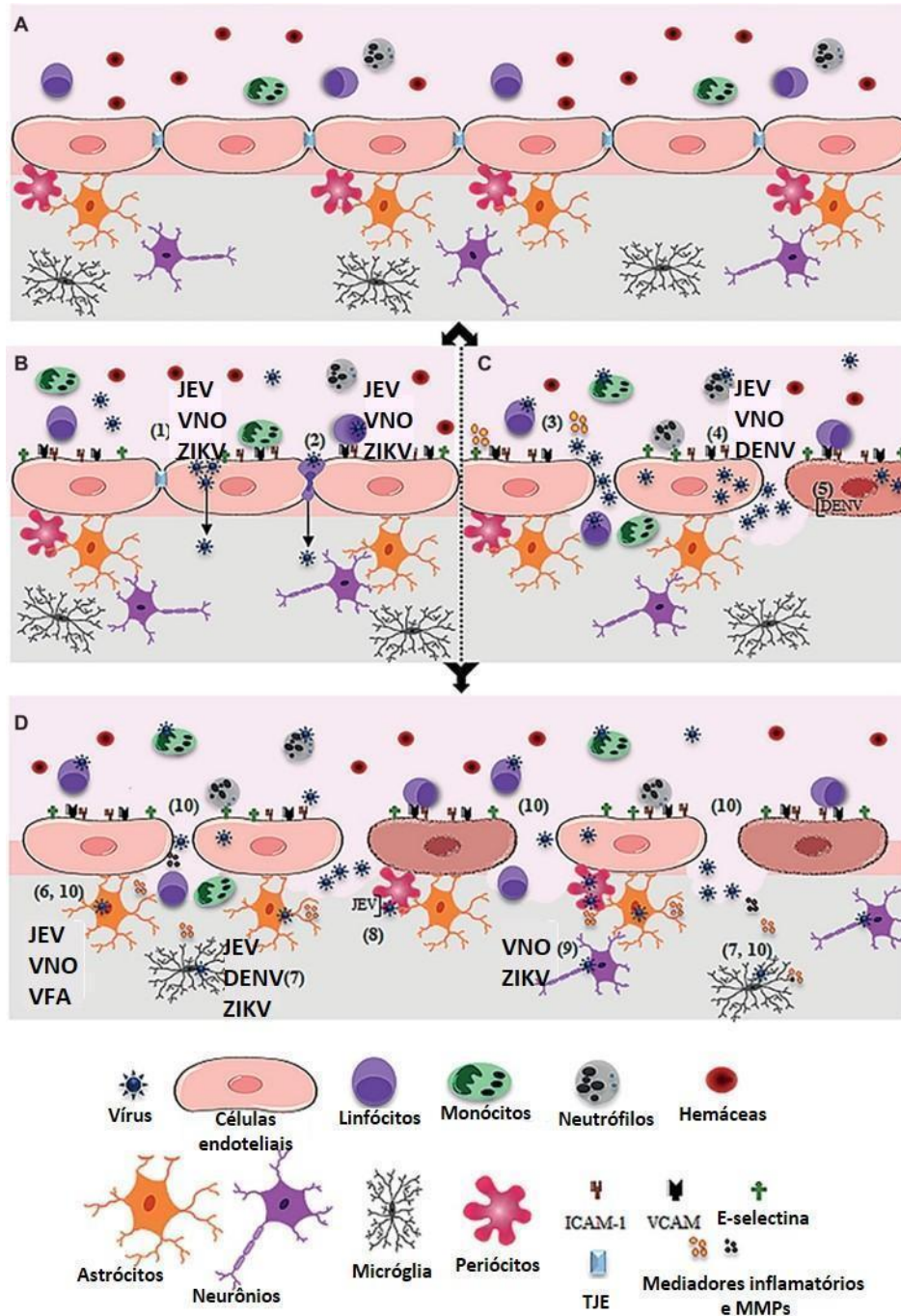
Na neuroinflamação induzida por ZIKV, a detecção de IFN –I (α/β) e -II (γ) em modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* têm sido frequentemente relatadas pela literatura, inclusive sendo apontados como um dos fatores contribuintes para a SCZ. (DOWALL et al., 2017; GOBILLOT et al., 2020; GOUTIÈRES, 2005; GRANT et al., 2016; LIMA et al., 2019). A assinatura imune decorrente da infecção e estimulação da via de IFN, resulta na liberação de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8/ CXCL-8, TNF, IL-13 e IL-17, quimiocinas CCL2/ MCP-1, CCL5/ RANTES, CXCL-9/ MIG, CXCL-10/ IP-10 e fator de crescimento G-CSF, todos envolvidos em processos neuropatológicos (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; LIMA et al., 2019; NAVECA et al., 2018). CXCL-10/ IP-10 parece estar associada à indução de morte de neurônios infectados com ZIKV (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; NAVECA et al., 2018). No DENV, quadros de paralisia já foram observados em estudos clínicos e experimentais, com CXCL-10/ IP-10 e CXCR-3 desempenhando papel central na patogenia induzida pelo vírus (NIRANJAN; MUTHUKUMARAVEL; JAMBULINGAM, 2019) (Figura 10).

Um outro forte indicador de morte neuronal é a expressão e liberação de IL-1 β e TNF (SHABAB et al., 2017). Junto a IL-8, uma citocina que também exerce função quimioatraente, IL-1 β , TNF, MCP-1, IL-6 e CCL5/ RANTES provocam alterações na permeabilidade da BHE, através de mecanismos já bem caracterizados na neuroinflamação mediada por JEV e VNO (HSIEH; JOHN, 2020; KLEIN et al., 2019; LI et al., 2015; MUSTAFÁ et al., 2019; ROE et al., 2012). A presença dessas moléculas induziu o aumento da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1, facilitando a migração de células imunes para dentro do SNC, através da interação com ligantes expressos na superfície dessas células (LI et al., 2015; ROE et al., 2012; ROE; ORILLO; VERMA, 2014). De acordo com Papa et al., (2017), o ZIKV infecta e ativa HBMECs, levando a produção de IFN-I e III, IL-6 e CCL5/ RANTES,

mas não relata alterações na sua permeabilidade, o que pode ser explicado pelo fato de que estas células tendem a se tornar resistentes ao efeito dos IFNs e a morte celular induzida por alguns vírus (MLADINICH; SCHWEDES; MACKOW, 2017). Infiltrações de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, além de calcificação, necrose, neurofagia e nódulos microgliais, já foram demonstrados em cortes histológicos de tecidos cerebrais fetais infectados com ZIKV (AZEVEDO et al., 2018; MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016). Uma das consequências da infiltração e ativação dessas células imunes, assim como da micróglia, é a liberação de substâncias neurotóxicas como NO e ROS, causando a morte do tecido injuriado e saudável adjacente (MUSTAFÁ et al., 2019; SHABAB et al., 2017) (Figura 10).

Ainda sobre o JEV e VNO, a produção aumentada de citocinas e quimiocinas também regula positivamente a expressão e atividade de MMPs -1, -2, -3 e -9, enzimas responsáveis pelo remodelamento de matriz extracelular, e normalmente expressas em níveis basais (HSIEH; JOHN, 2020; MUSTAFÁ et al., 2019; ROE et al., 2012). No ambiente imunopatogênico, as MMPs degradam as junções intercelulares, formadas por proteínas de junção aderentes (PJA) e proteínas de junção estreitas (PJE), cuja função é manter a integridade da BHE (PERSIDSKY et al., 2006). Quando degradadas, ocorre a abertura dos espaços celulares, que favorece ainda mais o fluxo de células e proteínas imunes presentes na circulação sistêmica, amplificando o processo neuroinflamatório e consequentemente os danos ao SNC (LI et al., 2015; MUSTAFÁ et al., 2019; ROE et al., 2012). Devido às similaridades do JEV e do VNO com o ZIKV, no que diz respeito a filogenia, capacidade neurotrópica e neuropatogênica, e ao perfil imune gerado em resposta à infecção, os mecanismos utilizados por esses vírus podem servir como base para a descoberta dos meios pelos quais a SCZ se desenvolve (Figura 10).

Figura 10- Neuroinflamação e quebra de barreira hematoencefálica mediada por Flavivírus



Fonte: Mustafá *et al.* (2019, tradução da autora)

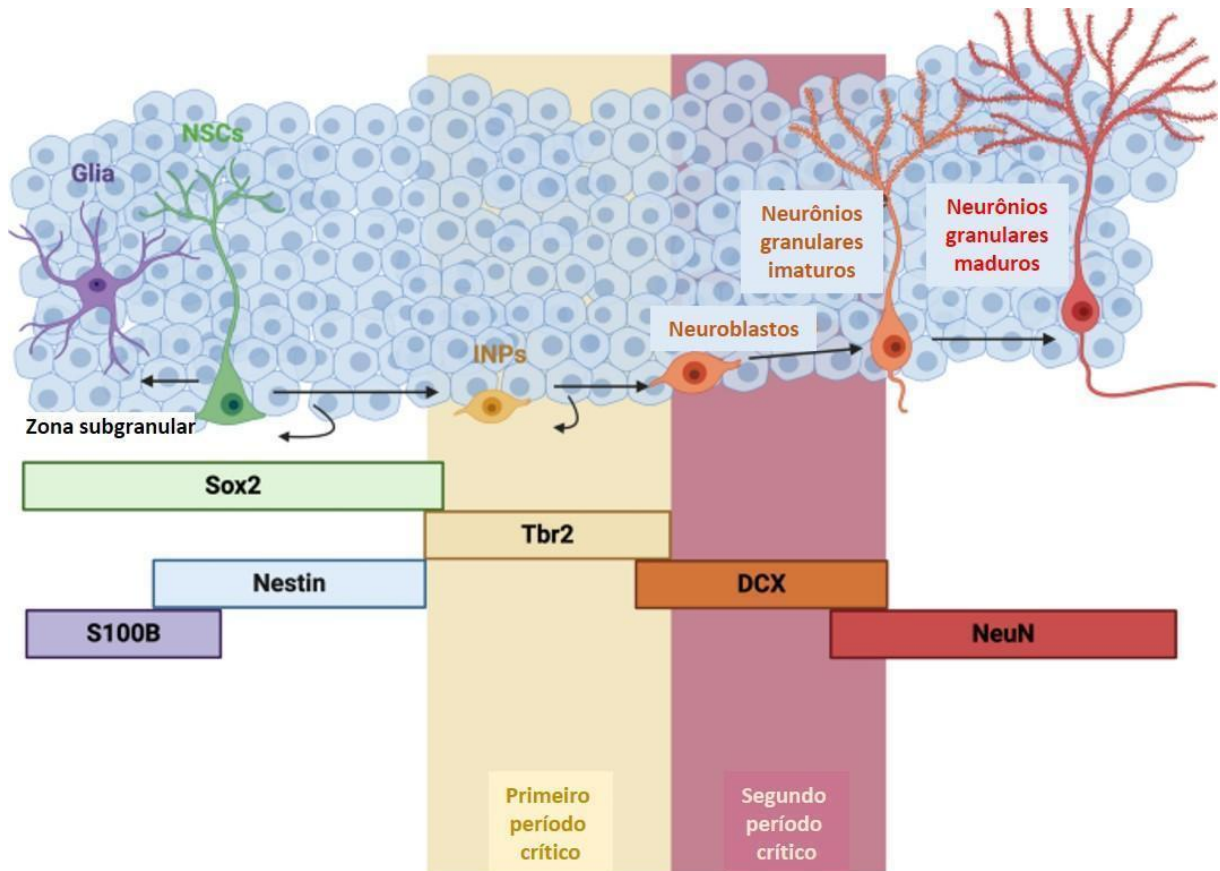
Legenda: Os Flavivírus neurotrópicos acessam o SNC por infectar e cruzar a BHE através de alguns mecanismos: B1) JEV, VNO e ZIKV atravessam a BHE como vírus livre de células, por meio de endocitose, exocitose e transcitose, e B2) através de leucócitos infectados. (C) Uma vez infectadas, as células endoteliais vasculares produzem mediadores inflamatórios (3), que junto a ação direta dos vírus nestas células, já podem induzir a regulação negativa de PJE (4), ou morte celular (5) e assim alterar a permeabilidade da barreira, favorecendo ainda mais a disseminação viral dentro do SNC. (D) Após a entrada no cérebro por qualquer uma das vias descritas (B1 e B2), os Flavivírus podem infectar astrócitos (6), micróglia (7), periócitos (8) e neurônios (9). A infecção dessas células, induz a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (IL-6, VEGF, TNF, IFN- γ , IL-1 β e IL-10, MCP-1), que favorecem o aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1, com consequente ativação e recrutamento de células imunes periféricas para o SNC, e, aumento de MMPs -2, -3 e -9 (10), que degradam PJAs e PJs, resultando na quebra de BHE.

2.11.1 Neurogênese: um breve resumo

O desenvolvimento do SNC tem início na fase embrionária, a partir de três centros germinativos, conhecidos como ectoderme, mesoderme e endoderme (ELSHAZZLY et al., 2021; URBÁN; GUILLEMOT, 2014). A ectoderme é o centro especializado para a formação do tubo e a crista neural, a partir de células tronco neurais (NSCs, do inglês, *Neural Stem Cells*) (ELSHAZZLY et al., 2021; URBÁN; GUILLEMOT, 2014). O processo pelo qual as NSCs se proliferam e diferenciam-se em neurônios maduros é chamado de neurogênese e sua regulação está ligada à atividade de diversos genes (URBÁN; GUILLEMOT, 2014) (Figura 11). Crucial para o desenvolvimento do SNC no período embrionário, estende ao longo da vida pela presença de zonas neurogênicas no cérebro adulto (ELSHAZZLY et al., 2021; URBÁN; GUILLEMOT, 2014).

As NSCs são recrutadas e dividem-se em células progenitoras neurais intermediárias (INPs, do inglês, *Intermediate Neural Progenitors*) (KHUU et al., 2021; OVERALL; KEMPERMANN, 2018). Estas, tornam-se menos proliferativas e passam a adquirir características determinadas por linhagem, conduzindo à formação de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (OVERALL; KEMPERMANN, 2018). A maturação dos neuroblastos, dá origem a neurônios imaturos, caracterizados pela presença de grânulos e formação de neuritos (OVERALL; KEMPERMANN, 2018). Por fim, o prolongamento dos neuritos, mielinização, sinaptogênese e integração funcional ocorrem, dando origem às células neuronais maduras, completamente funcionais (OVERALL; KEMPERMANN, 2018) (Figura 11).

Figura 11- Neurogênese



Fonte: Khuu *et al.* (2021, tradução da autora)

Legenda: A neurogênese ocorre a partir do recrutamento de SNCs, que se dividem em células INPs. As INPs têm alta taxa de proliferação e diferenciam-se em neuroblastos. Estes, por sua vez, originam os neurônios imaturos que já apresentam alguns neuritos e grânulos. As células neuronais maduras, completamente funcionais, resultam do prolongamento dos neuritos, da mielinização, sinaptogênese e integração funcional.

O ZIKV influencia negativamente o funcionamento de processos celulares básicos, porém extremamente necessários à perfeita formação do SNC (FERRARIS *et al.*, 2019; GABRIEL *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016). Proliferação, diferenciação e maturação de células neuronais, além da regulação positiva de proteínas e vias pró-apoptóticas e pró-inflamatórias, estão entre os mecanismos mais prejudicados pela ação do ZIKV (FERRARIS *et al.*, 2019b; GABRIEL *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2016). O estágio de diferenciação em que as células se encontram no momento da infecção, também influencia diretamente na neuropatogenicidade (FERRARIS *et al.*, 2019). Células em estágios iniciais de diferenciação, como hiNPCs e neuroblastos apresentam maior suscetibilidade e permissividade à infecção, enquanto neurônios e astrócitos maduros são mais resistentes aos efeitos deletérios da mesma (FERRARIS *et al.*, 2019).

Por serem um dos principais alvos da infecção por ZIKV, os neurônios são fundamentais para o início da sinalização imune (KLEIN et al., 2019). Uma vez infectados, produzem IFN-I, CXCL-10/ IP-10 e CCL5/ RANTES, entre outras citocinas, que contribuem tanto para o estabelecimento da imunidade antiviral, quanto para o recrutamento de células imunes para dentro do SNC (KLEIN et al., 2019; LIMA et al., 2019). A regulação da BHE também é um processo parcialmente dependente da atividade neuronal, tanto para sua formação e maturação durante o período embrionário, quanto na ativação e funcionamento do endotélio vascular cerebral em resposta a neuroinflamação (SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019).

As células SH-SY5Y correspondem a uma linhagem de neuroblastomas amplamente utilizadas para fins de pesquisa. São uma alternativa mais barata e reprodutível do que o cultivo primário de células embrionárias neuronais (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Estas células foram obtidas a partir de uma amostra de tumor ósseo metastático, que passou por três processos de transformação e foram então depositadas na ATCC como SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Apresentam marcadores neuronais imaturos, que as caracterizam como neurônios catecolaminérgicos (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Em cultura, apresentam-se como células aderentes – aglomerados de células neuroblásticas com formação de neuritos (projeções curtas e finas) – e de suspensão (células arredondadas), e, respondem de forma positiva a métodos de diferenciação, principalmente por ácido retinóico (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). No mais, têm se mostrado um bom modelo para estudos da neuro e imuno patogenicidade da infecção por ZIKV, e por isso, foram utilizadas neste trabalho (LIMA et al., 2019; SÁNCHEZ-SAN et al., 2018).

2.11.2 Barreira Hematoencefálica: estrutura e organização

A BHE é uma estrutura física, metabólica e de transporte, que regula a troca de substâncias e células imunes na interface sangue e encéfalo, além de proteger contra patógenos invasores e regular a neuroinflamação (PERSIDSKY et al., 2006; SPINDLER; HSU, 2012). É formada principalmente por BMVECs, matriz extracelular, células microgliais, astrócitos, periócitos e neurônios, que se conectam inter e paracelularmente através de junções estreitas (JE) e junções aderentes (JA),

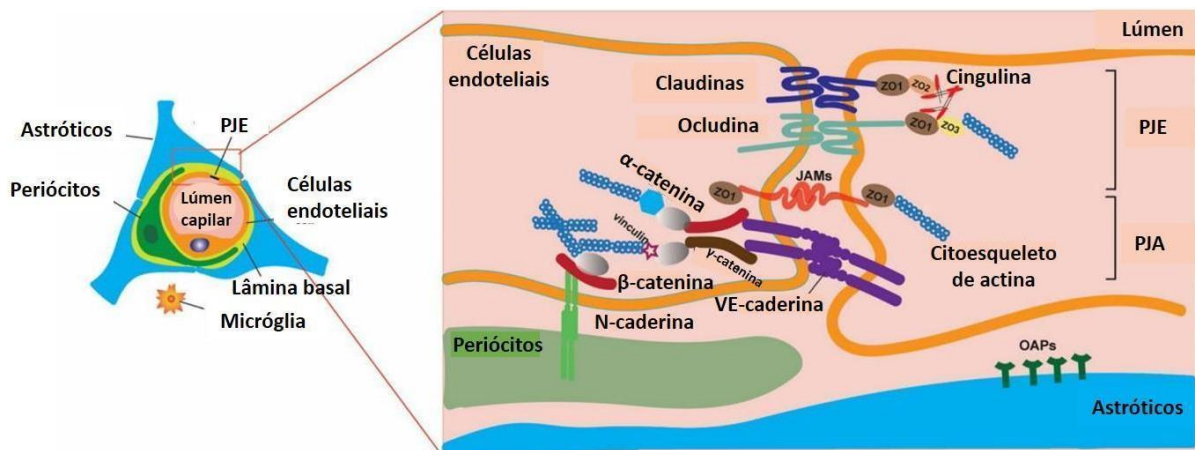
respectivamente (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; PERSIDSKY et al., 2006; SONAR; LAL, 2018; SPINDLER; HSU, 2012; SWEENEY et al., 2019) (Figura 12). Além disso, as BMVECs apresentam outras características estruturais e funcionais particulares, que contribuem para a homeostase do SNC (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; SONAR; LAL, 2018; SPINDLER; HSU, 2012; SWEENEY et al., 2019). A presença dessas junções, por exemplo, diminui o transporte vesicular de solutos entre as faces luminal (BHE-circulação) e abluminal (BHE-cérebro) das BMVECs (SONAR; LAL, 2018). Associado a isso, o movimento direcional dessas moléculas solúveis, de íons e de células imunes, é regulado pela diferença de polaridade existente entre as duas faces celulares, de modo que, na face luminal há um maior fluxo de transportadores que conduzem os nutrientes no sentido circulação – BHE – cérebro, enquanto a face abluminal realiza o efluxo de lixo metabólico via cérebro – BHE – circulação (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; SONAR; LAL, 2018).

O desenvolvimento da BHE tem início na oitava semana de gestação, a partir de células precursoras endoteliais que entram na neuroectoderme (SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019). Inicialmente, o processo é mediado pela liberação de VEGF por células precursoras neurais, junto a proteínas (β -catenina, por exemplo) e vias de sinalização específicas, que regulam a construção de uma estrutura endotelial básica, caracterizada pela presença de JE, transportadores de nutrientes, inúmeras vesículas de transcitose e alta expressão de moléculas de adesão leucocitárias (SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019). Posteriormente, a interação de BMVECs com periócitos e astrócitos, induz a maturação dessa barreira, um processo marcado por alterações estruturais e fisiológicas, como: formação de matriz extracelular, redução da expressão de MACs, formação de JA, aumento da formação e maturação de JE e transcitose reduzida (SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019). Uma vez que o processo de formação e maturação são completados, regulam o microambiente do SNC durante toda a vida (SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019).

As junções intercelulares são formadas basicamente por PJEs (claudina, ocludina e moléculas de adesão juncional -1, -2 e -3 (JAMs, do Inglês, *Junction Adhesion Molecules*) e PJAs (VE-caderina e vinculina), que interagem com as proteínas de ancoragem, zônula-occludens (ZO) -1, -2, -3 e cateninas, respectivamente, presentes no citoesqueleto de actina (KADRY; NOORANI;

CUCULLO, 2020; KLEIN et al., 2019; PERSIDSKY et al., 2006; SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019). As conexões PJA-cateninas apresentam-se como estruturas adesivas em forma de zíper, e exercem uma função de suporte, que contribui para a integridade da barreira, além de influenciarem no desenvolvimento das JEs (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; KLEIN et al., 2019; PERSIDSKY et al., 2006; SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019). O fato das proteínas de ancoragem, principalmente ZO-1, -2 e -3, estarem localizadas no citoesqueleto de actina, faz dessa estrutura, um componente chave na estabilidade das JEs, e consequentemente da BHE (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; SONAR; LAL, 2018; SPINDLER; HSU, 2012) (Figura 12).

Figura 12- Estrutura e organização da BHE



Fonte: Kadry; Noorani; Cucullo (2020, tradução da autora)

Legenda: A BHE é formada principalmente por BMVECs, matriz extracelular, células microgliais, astrócitos, periócitos e neurônios, que se conectam inter e paracelularmente através de junções estreitas (JE) e junções aderentes (JA). Estas junções são formadas pelas PJE (claudina, ocludina e JAMs -1, -2 e -3) e PJAs (VE-caderina e vinculina), que conectam-se às proteínas adaptadoras ZO -1, -2, -3 e cateninas, respectivamente, localizadas no citoesqueleto de actina. Esta interação, fecha os espaços intercelulares, garantindo a integridade da BHE e o controle da troca de moléculas entre o sangue e o SNC.

O citoesqueleto de actina é essencial para a forma e movimento das células, fagocitose, comunicação intercelular e distribuição de organelas e proteínas citoplasmáticas (TAYLOR; KOYUNCU; ENQUIST, 2011). Na BHE, suas fibras de estresse ajudam a regular a contratilidade celular, por fornecer a força e movimentação necessárias à atividade de barreira (SPINDLER; HSU, 2012). Muito requerida nas infecções virais, a actina influencia em diversas fases do ciclo replicativo viral, contribuindo para os processos de entrada, montagem e liberação de novos vírions (TAYLOR; KOYUNCU; ENQUIST, 2011). Estes, por sua vez,

induzem alterações no citoesqueleto, que podem prejudicar o funcionamento celular (TAYLOR; KOYUNCU; ENQUIST, 2011). Dentre as alterações mais frequentemente observadas, estão o arredondamento celular, ruptura das fibras de estresse, perda de JAs e JEs, diminuição de projeções celulares (TAYLOR; KOYUNCU; ENQUIST, 2011). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, a infecção de HUVECs com ZIKV, induziu a despolimerização dos filamentos de actina e diminuição no tamanho e quantidade de projeções celulares logo nos minutos iniciais pós-infecção, sugerindo o uso da actina para entrada do vírus na célula-alvo (dados não publicados). Além dos efeitos virais diretos, o estresse oxidativo e liberação de quimiocinas como CCL2/ MCP-1 decorrentes do processo infeccioso, também contribuem para os rearranjos do citoesqueleto de actina em HMVECs, o que altera a localização e interação de PJs, prejudicando assim a estrutura e funcionamento da BHE (SPINDLER; HSU, 2012).

A contratilidade e integridade da BHE é também regulada pela atividade de MMPs (SPINDLER; HSU, 2012; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). Estas, por sua vez, são enzimas dependentes de zinco, que tem como função principal o remodelamento de matriz extracelular, incluindo colágeno, gelatinas, laminina, entre outros (YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). Tratam-se de proteases neutras, cuja ativação depende da degradação por outras MMPs, ou da exposição direta ou indireta ao estresse oxidativo (presença de ROS, por exemplo), enquanto que os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs, do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), regulam as suas atividades (ROSENBERG, 2002; SPINDLER; HSU, 2012; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). No SNC, são requeridas sob condições fisiológicas (expressas constitutivamente) e/ ou patológicas (induzidas por estresse), regulando os processos de neurogênese, angiogênese e a neuroinflamação (WANG; KHALIL, 2018; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). Sua atividade proteolítica, favorece a proliferação, diferenciação, renovação e morte de células gliais, neurais e HMVECs, além de contribuir para degradação de citocinas e PJs, mediando assim a neuroinflamação e a perda de integridade da BHE (YANG; HILL; ROSENBERG, 2011).

As principais MMPs envolvidas na homeostase do SNC e na neuroinflamação são: 1) as gelatinases -2 e -9, responsáveis pela degradação de colágeno tipo IV e gelatinas, e atuam na angiogênese, neurogênese, regeneração de axônios, remielinização, apoptose e degradação de matriz extracelular; e, 2) MMP-3, que

pertence ao subgrupo das estromelisininas, e participa de eventos de remodelação sináptica, degradação de matriz extracelular e apoptose (SPINDLER; HSU, 2012; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). A MMP-1, caracteriza-se como uma colagenase, que realiza a degradação do colágeno tipo I, II e III, no entanto, sua participação nos processos neuroinflamatórios ainda não é bem caracterizada (YANG; HILL; ROSENBERG, 2011; ZHOU et al., 2014). Acredita-se que possa estar associada à regulação da apoptose de neurônios e proliferação de astrócitos, além de favorecer a migração transendotelial de células imunes (CHOPRA; OVERALL; DUFOUR, 2019; VICTORIA et al., 2020; ZHOU et al., 2014). Na neuroinflamação, principalmente quando desencadeada por infecções virais, essas proteínas estão intimamente relacionadas a ruptura de BHE, por degradarem claudina, ocludinas e ZO-1, -2, e -3, mediante a regulação positiva de TNF, IL-1 β , CCL2/ MCP-1, IL-6 e IL-8. (AL-OBAIDI et al., 2018; ROE et al., 2012; SPINDLER; HSU, 2012; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). Uma vez que as MMPs são também ativadas por ROS e NO, o estresse oxidativo decorrente da infecção viral também contribuem para esse processo (SPINDLER; HSU, 2012).

A liberação dos mediadores inflamatórios também regula a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, principais moléculas de adesão celulares expressas pelo endotélio vascular cerebral, em resposta a inflamação (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020). Ambos pertencem à superfamília de imunoglobulinas e permitem a adesão das células imunes circulantes ao endotélio e consequente migração para o tecido injuriado (HARJUNPÄÄ et al., 2019). Esta interação depende da expressão das integrinas LFA-1 – expressa por linfócitos T e B, monócitos e granulócitos – e VLA-4 – presente em linfócitos T e monócitos –, que conectam-se a ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020). Dentro da cavidade neurovascular, estas células ampliam a resposta pró-inflamatória pela liberação de mais mediadores químicos e de compostos neurotóxicos como COX-2, NO e ROS, e produção de MMPs -2, -3 e -9 (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; MAN; UBOGU; RANSOHOFF, 2007; SWEENEY et al., 2019). Juntas essas moléculas aumentam a permeabilidade vascular e provocam danos extensos ao SNC (KLEIN et al., 2019).

A participação da BHE na neuroinflamação mediada por ZIKV, vem sendo estudada, porém com resultados ainda controversos na literatura. A infecção de HBMECs – linhagem celular que mimetiza um modelo de BHE para estudos *in vitro*

–, já foi comprovada (ALIMONTI et al., 2018; PAPA et al., 2017). Estudos *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a infecção é beneficiada pela expressão de AXL, principal receptor de entrada do vírus nesta célula (ALIMONTI et al., 2018; LEDA et al., 2019; PAPA et al., 2017). De acordo com Alimonti et al., (2018), o endotélio vascular cerebral parece atuar como um reservatório viral, que permite a infecção e persistência do ZIKV em células neuronais, além de induzir um perfil inflamatório similar àquele produzido por células residentes do SNC (ALIMONTI et al., 2018; LEDA et al., 2019; PAPA et al., 2017). Esses estudos relatam uma alteração de permeabilidade vascular, porém mantendo as PJs e PJAs íntegras, dentro dos intervalos de infecção analisados (ALIMONTI et al., 2018; PAPA et al., 2017). Diante da importância da BHE para regulação da resposta inflamatória mediada por vírus neuroinvasores como o ZIKV, associada a um número restrito de estudos que analisem essas características, torna-se necessária a realização de estudos como esse, uma vez que visa ampliar o entendimento acerca da neuroinflamação presente nos casos da SCZ.

3 JUSTIFICATIVA

A infecção congênita por ZIKV promove uma série de prejuízos ao desenvolvimento fetal e infantil. Alterações genéticas, carência nutricional, mecanismos epigenéticos, infecções recorrentes por arbovírus, como também a inflamação, vêm sendo sugeridos como possíveis causas – isoladas ou associadas – para o desenvolvimento da síndrome. Os processos inflamatórios, por sua vez, têm ganhado grande espaço nos debates sobre o assunto, uma vez que o contexto, a intensidade e o curso desta resposta, diferenciam a sua característica neuroprotetora, da sua capacidade de trazer prejuízos a estrutura e ao funcionamento do SNC em formação.

Nesta perspectiva, este trabalho pode ajudar a identificar moléculas e elucidar mecanismos específicos envolvidos na cascata inflamatória, possivelmente associadas ao desenvolvimento da SCZ. A compreensão destes, é o ponto de partida para a busca de tratamentos mais eficazes, como também para o desenvolvimento de vacinas. A imunoterapia baseada em anticorpos recombinantes direcionados para citocinas, quimiocinas e seus receptores, como é o caso do anti-TNF – já utilizado no tratamento de doenças reumáticas e autoimunes – pode ser uma alternativa mais rápida e bastante efetiva para o controle da resposta imune em grávidas e recém-nascidos, como também, da morbimortalidade associada à síndrome.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil imune da infecção congênita por ZIKV em LCR de crianças com microcefalia *versus* controle, assim como analisar o perfil imune em modelos de experimentação *in vitro*, através do uso de células de linhagem neuronal e endoteliais vasculares cerebrais.

4.1 Objetivos específicos

- Descrever o perfil imune da infecção com ZIKV em amostras de LCR de crianças com microcefalia *versus* controle saudável;
- Caracterizar a infecção de células SH-SY5Y e HBMECs por ZIKV;
- Quantificar citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de células SH-SY5Y e HBMECs infectadas por ZIKV *in vitro*;
- Investigar a expressão das MMPs -1, -2, -3 e -9 em células de linhagem neuronal e HBMECs infectadas com ZIKV *in vitro*;
- Avaliar a resposta imune inata por meio da expressão de TLRs -3, -7 e -9 e da quantificação de p38 em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV *in vitro*;
- Verificar a participação de IFN-I (α/β) na neuroinflamação induzida por ZIKV em células de linhagem neuronal *in vitro*;
- Avaliar o envolvimento do citoesqueleto de actina para à infecção de HBMECs por ZIKV;
- Analisar se o ZIKV altera a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECs *in vitro*;

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os tópicos a seguir abordam os processos metodológicos aplicados na construção deste trabalho, que incluem a definição da população de estudo, os procedimentos laboratoriais, análises estatísticas e considerações éticas.

5.1 Local do Experimento

A maioria dos experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ-PE. Todos os procedimentos operacionais padrão usados no IAM seguiram os regulamentos de biossegurança descritos no Plano Quadrienal da FIOCRUZ 2005/2008, e ISO 17025, além de conter todos os equipamentos requeridos para nível de segurança 2, de acordo com a Lei 11.105/2005 da CTNBio. O ensaio multiplex foi conduzido na Plataforma Luminex Fiocruz, Subunidade Luminex-RPT03C, Rede de Plataformas PDTIS, FIOCRUZ/ RJ.

5.2 População do estudo

Parte do estudo foi realizado em amostras biológicas de LCR bem caracterizadas oriundas do Banco de Amostras Biológicas do Serviço de Referência em Arbovírus (SRA), do LaViTE. Os LCRs foram obtidos através de punção lombar, realizada em recém-nascidos (RNs) – até 28 dias de vida – com suspeita de microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV, nascidos no Nordeste do Brasil, no período de janeiro de 2015 a abril de 2017. As amostras foram coletadas em hospitais distribuídos por todo o estado de Pernambuco e incluídas na plataforma GAL (LACEN-PE). Posteriormente, elas foram enviadas ao SRA para o diagnóstico de infecção por ZIKV. De forma resumida, o diagnóstico de microcefalia foi realizado seguindo os protocolos do Ministério da Saúde, os quais baseiam-se na medição do perímetro cefálico, tendo como valores de referência a tabela de crescimento de Fenton. Associado a isso, exames de imagem para auxílio diagnóstico foram utilizados sempre que possível. A infecção por ZIKV foi confirmada a partir de ensaios de RT-qPCR para detecção do RNA viral e/ ou ELISA para pesquisa de IgM anti-Zika. De acordo com os critérios de inclusão e exclusão

do estudo, as amostras foram classificadas como: 1) microcefalia: quando apresentavam circunferência da cabeça de pelo menos 2 DP abaixo da média para o mesmo sexo e idade gestacional, associado a diagnóstico positivo para ZIKV; 2) microcefalia grave: perímetro cefálico com pelo menos 3 DP abaixo da média mais resultado laboratorial positivo para ZIKV; e 3) controle saudável, trata-se de casos suspeitos de microcefalia ao nascer, que foram posteriormente descartados por ultrassonografia transfontanela do cérebro e que não apresentavam outros defeitos congênitos maiores. Neste último grupo, os resultados laboratoriais para ZIKV foram negativos. Como critérios de exclusão, foram consideradas: 1) presença de anencefalia, encefalocele, ou outra síndrome congênita bem definida; 2) detecção de RNA viral e/ ou de anticorpos IgM para outros arbovírus, que não o ZIKV, detectados na mãe ou no filho; 3) painel de testagem laboratorial STORCH positivo (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes simplex) na mãe ou na criança; e 4) disponibilidade de volume (mínimo de 60 µL) das amostras de LCR. Todas estas informações sobre o desenho do estudo, critérios de inclusão e exclusão, e a coleta de dados encontram-se mais detalhados em artigo previamente publicado por nosso grupo de pesquisa (LIMA et al., 2019a).

5.3 Desenho do estudo

Foram incluídas no estudo 78 amostras de LCR distribuídas em 2 grupos experimentais: 1) Microcefalia: amostras provenientes de casos confirmados de microcefalia (n=9) e microcefalia grave (42), com resultados de RT-PCR e/ ou pesquisa de IgM positivas para ZIKV; e 2) Controle saudável: ausência de microcefalia e outras alterações congênitas importantes, mais testes moleculares e sorológicos negativos para ZIKV, DENV, CHIKV e STORCH (n=27).

Para realização do ensaio multiplex, foram produzidas alíquotas de 60,0 µl de cada uma das amostras selecionadas. As alíquotas foram armazenadas em deep freezer a -80°C e posteriormente enviadas ao laboratório da rede de plataformas Luminex da Fiocruz/ RJ.

5.4 Ensaio Multiplex

O ensaio foi multiplex foi realizado nas amostras de LCR pela utilização do *Cytokine Human Magnetic 25-Plex Panel* (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany), através da plataforma Luminex, conforme as instruções do fabricante. As citocinas (GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, -7, -8, -10, -12 (p40/ p70), -13, -15, -17 e TNF) e quimiocinas (eotaxina, CXCL-10/ IP-10, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) que constituem este painel, tem os valores representados em picogramas por mililitro (pg/ ml). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7, sendo considerados os valores de média \pm DP.

5.5 Linhagens Celulares

5.5.1 Células SH-SY5Y (ATCC® CRL2266™)

As células neuronais humanas SH-SY5Y foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, BR) e cultivadas em garrafas de 75 cm³ em meio MEM (Minimum Essential Media, Gibco™)/ F12 (Ham's Nutrient Mixture F12, Gibco®) (1:1) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de solução de antibiótico penicilina/ estreptomicina (PEN/STREP), 1% de aminoácidos não essenciais (*Non-Essential Amino Acids - NEAA*) e 1% de piruvato de sódio e mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

5.5.2 HBMECs

As células endoteliais (HBMECs) foram gentilmente, doadas pela doutora Luciana de Arruda do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo Góes na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm³ em meio 199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB, 1% de solução de antibiótico PEN/STREP e 1% de NEAA foram mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

5.6 Vírus Zika

5.6.1 Identificação da amostra viral

A cepa ZIKV PE243/ 2015 (abreviatura de ZIKV//*H.sapiens*/Brazil/PE243/2015) utilizada nos experimentos foi previamente isolada em nosso laboratório, descrito por Donald et al., (2016).

5.6.2 Produção do estoque viral

Uma amostra do vírus foi inoculada em células VERO (ATCC® CCL81™) e incubada em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até que o efeito citopático fosse observado em quase todo o tapete celular. Após isto, a garrafa de cultura passou por um ciclo de congelamento e descongelamento e a suspensão foi transferida para um tubo tipo “falcon” e então centrifugada a 400g por 10 minutos sob temperatura de refrigeração (4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante – o qual contém as partículas virais – foi aliquotado em criotubos em um volume de 1,0 ml. A passagem do vírus utilizada para todos os experimentos foi a de número 3.

5.6.3 Titulação do estoque viral

O estoque viral foi titulado por meio de ensaio de placa. Para tanto, células Vero (3,0 x 10⁵ células/ poço) foram semeadas em placas de 24 poços e então infectadas com 7 diluições seriadas (1:10) dos estoques de ZIKV. Para cada diluição, 3 replicatas foram realizadas. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o meio semi-sólido (junção de duas partes iguais de metilcelulose 3% (CMC) e DMEM 2X) em volume final de 1,0 ml por poço foi adicionado ao inóculo. Após 6 dias de infecção, as placas foram fixadas com formalina e coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa (UFP/ml).

5.7 Infecção de células SH-SY5Y com ZIKV

Células SH-SY5Y (1,5 x 10⁵ céls/ poço) foram semeadas em placas de 48 poços e mantidas em estufa sob condições já detalhadas no tópico 5.5.1. Após adesão à placa, o meio de cultura foi removido e as células foram infectadas com

ZIKV (MOI=1,0, *Multiplicity of Infection*) e então incubadas em estufa por duas horas, com leve agitação a cada 15 minutos. Após este intervalo, o inóculo viral foi removido e foram adicionados 500,0 µl de meio MEM/ F12 a 2% de SFB nas células. Após isto, as células foram levadas à estufa até que se completassem os intervalos pós-infecção desejados (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós-infecção - hpi). Como controle negativo, foram utilizados um grupo de células não infectadas com ZIKV, o qual é denominado de MOCK. Os dois grupos foram compostos por três replicatas biológicas. Os sobrenadantes deste experimento foram aliqüotados em tubos tipo “eppendorf” de 500,0 µL devidamente identificados e então armazenados a -80°C para quantificação da carga viral por RT-qPCR e da produção de citocinas por CBA, conforme itens 5.16 e 5.14, respectivamente. Quanto ao tapete celular, estes foram tratados com tampão RLT adicionado de 1% de 2-mercaptoetanol e armazenados a -80°C até o uso. A coleta com tampão RLT conserva o RNA celular, para posterior extração, produção de cDNA e análise da expressão de genes por RT-PCR, conforme descrito nos itens 5.17 e 5.18.

5.8 Inativação viral com BPL e ensaio de placa

Com a finalidade de observar o efeito citopático e quantificar as partículas virais resultantes da infecção das células SH-SY5Y, $2,0 \times 10^6$ células foram infectadas com ZIKV (MOI de 1,0) e mantidas em estufa por 72 hpi. Após isto, as garrafas de cultura foram tratadas conforme item 5.6.2. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados, e parte deles tratados com Betapropiolactona (BPL) a 0,1% – um inativador químico viral –, e mantidos a 4°C, *overnight*, sob agitação constante. No dia seguinte, os sobrenadantes contendo as partículas virais infecciosas e aqueles com os vírus inativos foram aliqüotados em criotubos em um volume de 1,0 ml e então destinados a realização do ensaio de placa. Após o intervalo de 48 horas do plaqueamento de $1,0 \times 10^5$ células vero em placa de 24 poços, 200,0 µL dos sobrenadantes das culturas de células SH-SY5Y foram adicionados a placa de 24 poços e incubados por 1 hora em estufa de CO₂, a 37°C. Após esse período, meio semi-sólido foi adicionado aos poços e a placa incubada por 6 dias, fixada com formalina e corada com cristal violeta 3%. O efeito citopático e a contagem do número total de placas presentes nos sobrenadantes das culturas de

células SH-SY5Y foram determinados a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa (UFP/ml).

5.9 Inibição de IFN- α em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV

Células SH-SY5Y ($1,5 \times 10^5$ células/ poço) foram semeadas em placas de 48 poços e infectadas com ZIKV (MOI=0,5). Após a remoção do inóculo viral foram adicionadas duas concentrações de anti-IFN- α [1,0 e 10,0 ng/ml] diluídos em 500,0 μ l de meio MEM/ F12 a 2% de SFB as células infectadas e foram levadas à estufa até que se completassem os intervalos de análises (24, 48, 72 e 96 hpi). A fim de analisar o papel do IFN-I na infecção de células neuronais com ZIKV, a cada 24 hpi, foram realizados ensaios de morte celular através da marcação com anexina V⁺/ 7-AAD⁺ e imediatamente analisados por citometria de fluxo (item 5.13). Os sobrenadantes deste experimento foram aliqüotados em tubos tipo “eppendorf” de 500,0 μ L devidamente identificados e então armazenados a -80°C para quantificação da carga viral (itens 5.15 e 5.16) e da produção de citocinas e quimiocinas (5.14). Além do grupo ZIKV+ anti-IFN- α , foram adicionados o grupo MOCK – células não infectadas e não tratadas com anti-IFN- α ; e, ZIKV MOI=0,5 – células infectadas, mas não tratadas com anti-IFN- α . Todos os grupos foram compostos por três replicatas biológicas.

5.10 Inibição de p38 em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV

Um total de $2,0 \times 10^6$ células SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas T25cm². No dia seguinte o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com 10,0 μ M de SB202190, um inibidor da via de p38 e mantidas em estufa por 1 hora. Após este período, o SB202190 foi removido e então as células foram infectadas com ZIKV (MOI=0,5). Terminada a inoculação, 7,0 ml de meio MEM/ F12 a 2% de SFB foram adicionados as garrafas e estas foram mantidas em estufa até que se completassem os intervalos de leitura (0, 6, 12, 24 e 48 hpi). A cada intervalo, as células foram tripsinizadas e destinadas à análise da proteína p38 por *Immunoblot*, conforme item 5.19. Como controles do experimento, foram utilizados um grupo MOCK (células não infectadas e não tratadas com SB202190), um grupo SB202190 10,0 μ M (células não infectadas, porém tratadas com SB202190), e um grupo ZIKV

MOI=0,5 (células infectadas com ZIKV, porém não tratadas com SB202190). Além disso, a inibição de p38 também foi realizada em células SH-SY5Y ($1,5 \times 10^5$ células/ poço, infectadas com ZIKV MOI=1.0) cultivadas em placas de 48 e 24 poços. Deste último ensaio, os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de citocinas e quimiocinas por CBA (item 5.14), enquanto as células foram tratadas com tampão RLT e o RNA celular total foi utilizado para ensaios de expressão gênica, conforme itens 5.17 e 5.18, sendo aplicados os intervalos pós-infecção de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hpi. Ambos os experimentos incluem 4 grupos experimentais distintos, compostos por 3 replicatas biológicas, cada.

5.11 Infecção de HBMECs por ZIKV

Para analisar os efeitos da infecção por ZIKV em HBMECs, $5,0 \times 10^4$ células/ poço foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa sob condições já conhecidas até o dia seguinte. Uma vez aderidas à placa, o meio de cultura foi removido e as células foram infectadas com ZIKV (MOI=5,0) e então incubadas em estufa por duas horas, com leve agitação a cada 15 minutos. Após este intervalo, o inóculo viral foi removido e foram adicionados 500,0 µl de meio 199 a 2% de SFB nas células. Após isto, as células foram mantidas em estufa até que se completasse os intervalos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hpi. Assim como no tópico 5.5, este experimento apresenta um grupo controle não infectado (MOCK) e três replicatas biológicas por grupo. Os sobrenadantes foram aliqüotados e armazenados a -80°C para quantificação da carga viral por RT-qPCR (item 5.15 e 5.16) e da produção de citocinas por CBA (item 5.14). Os tapetes celulares destinaram-se à marcação de ICAM-1 e VCAM-1 por citometria de fluxo (item 5.20), como também à análise da expressão de genes por RT-qPCR (item 5.17 e 5.18).

5.12 Inibição do citoesqueleto de actina em HBMECs infectadas por ZIKV

$5,0 \times 10^4$ HBMECs foram cultivadas em placas de 24 poços e então infectadas com ZIKV (MOI=1,0). Após remoção do inóculo viral, as células receberam diferentes concentrações de citocalasina D (0,5, 1,0 e 2,0 µM), um inibidor da polimerização da actina, largamente utilizado na literatura. Uma vez que o inibidor foi adicionado, as placas voltaram para a estufa até os intervalos de análises

(0, 24, 48 e 72 hpi). A cada 24 hpi, tanto os sobrenadantes de cultura, quanto as células, foram destinados a extração de RNA viral (5.15) e RNA celular total (item 5.16), respectivamente, e então o ensaio de RT-qPCR (item 5.16) foi aplicado para quantificação do RNA viral presente nos sobrenadantes e extratos celulares. Em todos os intervalos foram inclusos controles negativos (células não infectadas com ZIKV, tratadas ou não com Cit D 2,0 μ M) e positivos (células infectadas com ZIKV, sem tratamento com Cit D). Todos os grupos experimentais são compostos por 3 replicatas biológicas.

5.13 Análise de morte celular

Para analisar a taxa de morte celular, células SH-SY5Y descritas no item 5.9 foram marcadas com Anexina V-FITC/ 7-AAD-PE e analisadas por citometria de fluxo. Após cada intervalo pós-infecção as células foram tripsinizadas, transferidas para placa de 96 poços fundo U e então centrifugadas a 230g/ 5 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, o *pellet* passou por dois ciclos de lavagem com PBS 1x gelado, e foram então ressuspensas em 100,0 μ L de 1x Binding Buffer, seguido da adição de 5,0 μ L de Anexina-V/ FITC (BD Scientific) e 5,0 μ L de 7-AAD/ PE (BioLegend) para cada teste. A placa foi incubada por 15 minutos a T.A. protegida da luz. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de citometria e a leitura imediata das amostras foi realizada em citômetro FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os dados foram obtidos no software FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e analisados no FlowJo V10.

5.14 Citometric Bead Array (CBA)

A quantificação das citocinas pró-inflamatórias (IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8) foi realizada através do kit *Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array* (BD BioSystems®), nos sobrenadantes de cultura obtidos nos experimentos descritos nos itens 5.7 5.10 e 5.11. O painel de quimiocinas (IL-8, CCL5/ RANTES, CXCL-9/ MIG, CCL2/ MCP-1 e CXCL-10/ IP-10) foi analisado pelo kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine* (BD BioSystems®), foi realizado nos sobrenadantes obtidos no ensaio de inibição de IFN- α (item 5.9). Ambos os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das

amostras foi realizada no citômetro FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) com obtenção e análise dos dados utilizando o *software* FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

5.15 Extração de RNA viral

O RNA viral foi extraído dos sobrenadantes das culturas celulares descritas nos itens 5.7, 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12 utilizando o ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep Custom (Promega, Alemanha), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração, os RNAs foram estocados a -80°C até realização da RT-qPCR.

5.16 Quantificação viral por RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada para quantificação relativa do RNA viral empregando-se primers previamente descritos por Lanciotti et al., 2008, e de acordo com protocolos estabelecidos pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC), EUA. Para as reações de RT-qPCR foram utilizados o Kit QIAGEN One Step RT-qPCR (QIAGEN, Alemanha). Esse kit realiza a confecção do cDNA seguida da PCR em um único passo, minimizando etapas experimentais. Para realização da técnica foram seguidas as orientações do fabricante. Para a curva padrão – essencial à quantificação da carga viral – o RNA foi extraído de amostra de cultura celular contendo ZIKV previamente titulado ($5,0 \times 10^6$ UFP/ ml). Foram Preparados 6 tubos tipo “eppendorf” de 0,2 ml com 40,5 µL de água nuclease *free* e 4,5 µL da amostra nas diluições (1:10), após diluição as amostras foram vortexadas por 3 segundos. Como o estoque de vírus estava a $5,0 \times 10^6$ UFP/ml, e o RNA extraído deste estoque foi eluído em 60 µL do tampão de eluição, então 4,5 µL de RNA (volume utilizado para cada reação de RT-qPCR) corresponde a 52.500 UFP/ ml. Assim, a diluição abaixo representa:

Quadro 1- Diluições da curva padrão para quantificação relativa do RNA viral

Diluições	Número de cópias de RNA viral
Amostra Pura	52.500
Diluição 10^{-1}	5.250

Diluição 10⁻²	525,0
Diluição 10⁻³	52,5
Diluição 10⁻⁴	5,25
Diluição 10⁻⁵	0,525

Fonte: A autora

5.17 Extração de RNA celular total e confecção do cDNA

Para a extração do RNA celular total utilizado o Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Este kit permite a purificação do RNA a partir de pequenas quantidades de tecidos ou células, através de coluna de sílica. Após a extração, o RNA foi quantificado utilizando o Nanodrop 2000 (ThermoFisher, Waltham, MA) e então todas as amostras foram ajustadas para 200 ng totais/ 20 µL. A partir de então, o cDNA foi produzido utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, Waltham, MA) e armazenados a -80° C até o uso. A extração foi realizada nos extratos celulares tratados com tampão RLT, conforme descrito nos itens 5.7 e 5.11.

5.18 Análises de expressão gênica

Para a determinação da expressão gênica foram utilizados cDNAs obtidos dos ensaios descritos nos itens 5.7 e 5.11. O ensaio foi realizado utilizando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) e primers específicos para os genes alvo (MMP-1, -2, -3 e -9) e gene endógeno (pPIA, do Inglês, *Peptidylprolyl Isomerase A*), conforme tabela 2. Para cada reação foram utilizados 5,0 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix, 1,0 µL de primer forward 100 µM, 1,0 µL de primer reverse 100 µM, 1,0 µL de água livre de RNase e DNase e 2,0 µL de cDNA (200 ng). Para análises da expressão de TLR -3, -7 e -9, IFNA1 e IFNB1, foram utilizados o kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) e sondas comercialmente disponíveis. Para estes genes, o *GAPDH* (do Inglês, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) foi escolhido como controle endógeno. Os procedimentos experimentais foram

conduzidos de acordo com as instruções do fabricante. Após montagem as placas foram levadas ao equipamento QuantStudio™ 5 System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) para amplificação do material genético. O *fold-change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_t$ tomando o grupo controle como referência e foi considerado significativo quando >2 .

Quadro 2- Identificação dos primers e sondas

NM	Alvo	Sequência
NM_021130.5	PPIA	F: 5'-CCGTGTTCTTCGACATTGCC-3' R: 5'-TTGTCTGCAAACAGCTCAAAGG-3'
NM_022551.3	18S rRNA	F: 5'-CCGTGTTCTTCGACATTGCC-3' R: 5'-TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG-3'
NM_001145938	MMP1	F: 5'-AAAGGGAATAAGTACTGGGC-3' R: 5'-CAGTGTTTTCTCAGAAAGAG-3'
NM_004530.6	MMP2	F: 5'-ACCCATTTACACCTACACCAAG-3' R 5'-TGTTTGCAGATCTCAGGAGTG-3'
NM_002422	MMP3	F 5'-TAAAGACAGGCACTTTTGG-3 R 5'GAGATGGCCAAAATGAAGAG
NM_004994.3	MMP9	F: 5'- TCGACGATGACGAGTTGTGG -3' R: 5'- GGTGTAGAGTCTCTCGCTGG -3'

Fonte: A autora

5.19 Immunoblot

5.19.1 Preparação dos extratos proteicos

Os precipitados de células para a extração protéica foram obtidos por meio da lise e centrifugação de $2,0 \times 10^6$ células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI = 0,5) e tratadas com SB202190, conforme descrito no item 5.10. As proteínas foram extraídas em tampão de lise RIPA (Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland) contendo inibidores de proteases e fosfatases (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Duzentos microlitros do tampão foram adicionados sobre os precipitados celulares os quais foram desagregados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos. Depois deste período foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 30

minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados. Todos os extratos protéicos foram imediatamente armazenados em freezer -80°C, no qual foram mantidos até a realização das análises subsequentes. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford usando reagente comercial, seguindo as instruções do fabricante (Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland).

5.19.2 Western blotting

Para a detecção da fosforilação da proteína p38 nas células infectadas, os extratos protéicos foram submetidos ao método de Western Blot. As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli a fim de se obter a quantidade de 30,0 µg em 20,0 µL, foram desnaturadas à 95°C por 5 minutos e aplicadas as canaletas do gel de poliacrilamida 12% para o seu fracionamento. Em um dos poços foram aplicados 5,0 µL do marcador de peso molecular pré-corado (Thermo Scientific, EUA). A etapa subsequente à eletroforese, foi a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose com o auxílio do sistema de transferência Transf Dry (BioRad). Após isso, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 2 horas imersa em solução de bloqueio (contendo TBS- Tween e 5% de leite desnatado) sob agitação, a T.A. Após essa etapa a membrana foi submetida a 3 lavagens com TBS-T (TBS 0,1% Tween), incubada overnight sob agitação com o anticorpo primário Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Rabbit mAb, da Cell Signaling Technology® específico para a proteína alvo. Após mais 3 etapas lavagens, o anticorpo secundário Goat pAb to Rb IgG (HRP) (ABCAM, Cambridge, Reino Unido) foi adicionado a membrana e mantida sob agitação por 2h, a T.A. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS-T e revelada no equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), utilizando o kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (1:1) segundo o protocolo do fabricante. Como controle endógeno do experimento, foi realizada a marcação da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), seguindo o mesmo protocolo, havendo alteração apenas da diluição do anticorpo primário, anti-GAPDH (diluição 1:1000).

5.20 Marcação de ICAM-1 e VCAM-1

A expressão das moléculas de adesão celulares ICAM-1 e VCAM-1 foi realizada por citometria de fluxo nas HBMECs descritas no item 5.6 pela marcação com anti-ICAM-1-PerCp e Anti-VCAM-1-PE. Para isto, a cada intervalo pós-infecção as células foram tripsinizadas, transferidas para placa de 96 poços fundo U e centrifugadas a 230g/ 5 minutos a 4°C. Ao final de dois ciclos de lavagem com PBS 1x gelado, as células foram ressuspensas em 100,0 µL de PBS 1X gelado adicionado de 2% de SFB, seguido da adição de 1,0 µL de ICAM-1-PerCp e 7,5 µL de VCAM-1-PE para cada teste (Invitrogen, Califórnia, EUA). A placa foi incubada por 30 minutos a 4°C, protegida da luz. Posterior a incubação, as suspensões celulares foram mais uma vez centrifugadas, ressuspensas em 300,0 µL de PBS 1x e transferidas para tubos de citometria. A leitura imediata das amostras foi realizada em citômetro FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os dados foram obtidos no software FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e analisados no FlowJo V10.

5.21 Análises estatísticas

As análises estatísticas do ensaio multiplex foram realizadas através do teste de Mann-Whitney não pareado, para comparar variáveis contínuas. Os resultados foram expressos como diagramas de caixa, mostrando mediana, quartil superior e inferior, valores mínimo e máximo. Os *outliers* são representados por pontos fora do intervalo interquartil. Todos os valores de p foram bilaterais com um nível de significância de 0,05. Os cálculos foram realizados usando o software GraphPad Prism 7. Para os ensaios *in vitro*, foram realizados testes estatísticos paramétricos (teste t pareado, One-way ANOVA e Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni) e não-paramétricos, de acordo com as variáveis, utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.0. Somente os resultados com valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.22 Aspectos éticos

As amostras biológicas utilizadas nesse trabalho, constituem o Banco de Amostras de LCR do Serviço de Referência em Arbovírus (SRA), presente no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Instituto Aggeu

Magalhães (IAM), Fiocruz – PE e, foram tratadas de acordo com a resolução 441/11 e portaria 2.201/11. O uso das mesmas foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição acima citada, sob o registro CAAE: 73669417.7.0000.5190.

6 RESULTADOS

Esse tópico compreende os resultados obtidos a partir dos ensaios experimentais acima descritos.

6.1 Caracterização das amostras clínicas incluídas no estudo

Dos casos suspeitos de microcefalia associada a infecção com ZIKV, que deram entrada no SRA, 78 deles foram incluídos, considerando os critérios de inclusão e exclusão anteriormente descritos neste trabalho. Destes, 27 indivíduos foram identificados como controle saudável, uma vez que não apresentavam qualquer alteração no desenvolvimento, nem positividade para ZIKV nos exames laboratoriais. O outro grupo de análise foi denominado como microcefalia (n= 51), e corresponde a 11 (21,6%) casos de microcefalia e 40 (78,4%) de microcefalia grave, todas associadas à infecção congênita por ZIKV. A detecção de IgM anti-Zika foi observada em 96% das amostras de LCR, confirmando assim a infecção, enquanto que nos 4% restantes, essa confirmação ocorreu por RT-qPCR. Em ambos os grupos, a maior porcentagem é de recém-nascidos à termo (controle saudável (77,8%) e microcefalia (86,2%)), com peso ao nascer dentro da normalidade esperada para essa faixa etária (≥ 2.500 g). Em relação a sintomatologia de Zika durante o período gestacional, 96,2% e 68,6% das mães do grupo controle saudável e do grupo microcefalia, respectivamente, foram assintomáticas. Dentro do grupo microcefalia, 31,3% das mães foram sintomáticas, com presença de rash (31,3%), febre (21,5%) e artralgia (5,8%). No grupo controle, apenas uma gestante apresentou sintomas compatíveis à Febre do Zika, porém, a infecção por este ou outro arbovírus foi descartada laboratorialmente. Todas as características clínicas dos pacientes estão sumarizadas na tabela 1 e no anexo B deste documento, e já se encontram publicados (LIMA et al., 2019a).

Tabela 1- Características dos participantes incluídos no estudo

	Controle Saudável	Microcefalia
	N (%)	N (%)
Número total de indivíduos – neonatos	27	51
Masculino	10 (37)	22 (43)
Feminino	17 (63)	29 (57)
Idade gestacional no nascimento		
Pré-termo	5 (18.5)	5 (9.8)
A termo	21 (77.8)	44 (86.2)
Pós-termo	1 (3.7)	2 (4)
Peso ao nascer (gramas)		
≥2.500 g	19 (70.4)	39 (76.5)
>1.500 ≤2.499,9 g	8 (29.6)	10 (19.6)
<1.500 g	0	1 (1.95)
Não informado	0	1 (1.95)
Circunferência da cabeça		
Normal	27 (100)	0
<2 DP (microcefalia)	0	11 (21.6)
<3 DP (microcefalia grave)	0	40 (78.4)
Resultados laboratoriais		
RT-PCR (Detecção de RNA viral)+	0	2 (4)
IgM Anti-ZIKV +	0	49 (96)
Número total de indivíduos – mães	27	51
Sintomatologia durante a gravidez		
Sem sintomas	26 (96.2)	35 (68.6)
Rash	1 (3.7)	16 (31.3)
Febre	1 (3.7)	11 (21.5)
Outros sintomas (artralgia)	1 (3.7)	3 (5.8)

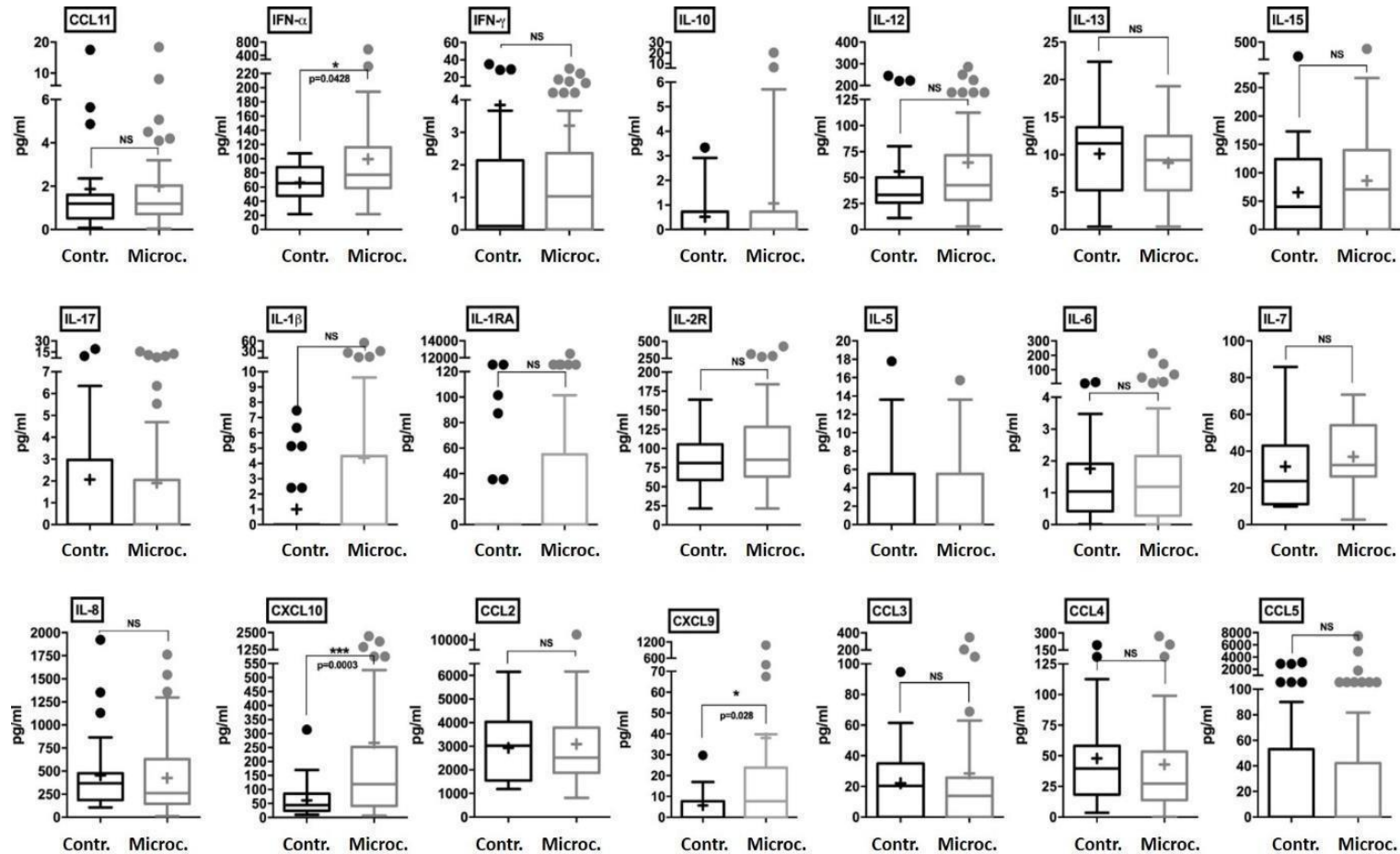
Fonte: Lima et al. (2019, publicação nossa).

6.2 RNs com microcefalia associada a infecção congênita por ZIKV apresentam concentrações elevadas de mediadores pró-inflamatórios no SNC

O perfil imune inflamatório das amostras de LCR oriundas de RNs com SCZ, foi obtido a partir de um painel de 25 mediadores inflamatórios, distribuídos entre citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Interessantemente, as amostras do grupo microcefalia apresentaram aumento estatisticamente significativo na quantificação de IFN- α , quando comparado ao grupo controle saudável ($p < 0,05$) (Figura 13). Níveis elevados de CXCL-9/ MIG e CXCL-10/ IP-10 ($p < 0,05$), quimiocinas importantes para a migração, diferenciação e ativação de células

imunes, como para a ativação de vias pró-apoptóticas foram observados no grupo de casos (Figura 13). As citocinas IFN- γ , IL-6 e IL-8 apresentaram um perfil similar entre os grupos analisados, enquanto IL-1 β e IL1-RA, encontraram-se levemente aumentadas no grupo microcefalia, porém com valor de $p > 0,05$ (Figura 13). As quimiocinas CCL2/ MCP-1, CCL3, CCL4 e CCL5/ RANTES e CCL11, citocinas IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, e receptor de interleucina-2 (IL-2R), também foram detectados em níveis levemente aumentados, entretanto, sem significância estatística (Figura 13). Dos 25 mediadores inflamatórios analisados, apenas GM-CSF, TNF, IL-2 e IL-4 foram indetectáveis em ambos os grupos (dados não mostrados). Estes dados sugerem uma ativação persistente de mediadores pró-inflamatórios no SNC de RNs com SCZ. Este foi um dos primeiros trabalhos a apresentar tais resultados, a partir de um número consistente de amostras caso vs. controle bem caracterizadas. Devido a importância destes achados, nos propusemos a explorar de forma mais consistente a influência da resposta pró-inflamatória da infecção congênita por ZIKV, através de ensaios de infecção *in vitro*, utilizando células humanas de linhagem neuronal e endoteliais vasculares na tentativa de modelar o ambiente inflamatório assim como em avaliar o papel de cada citocina individual.

Figura 13- Perfil imune em LCR de RNs com microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV



Fonte: Lima et al. (2019, publicação nossa).

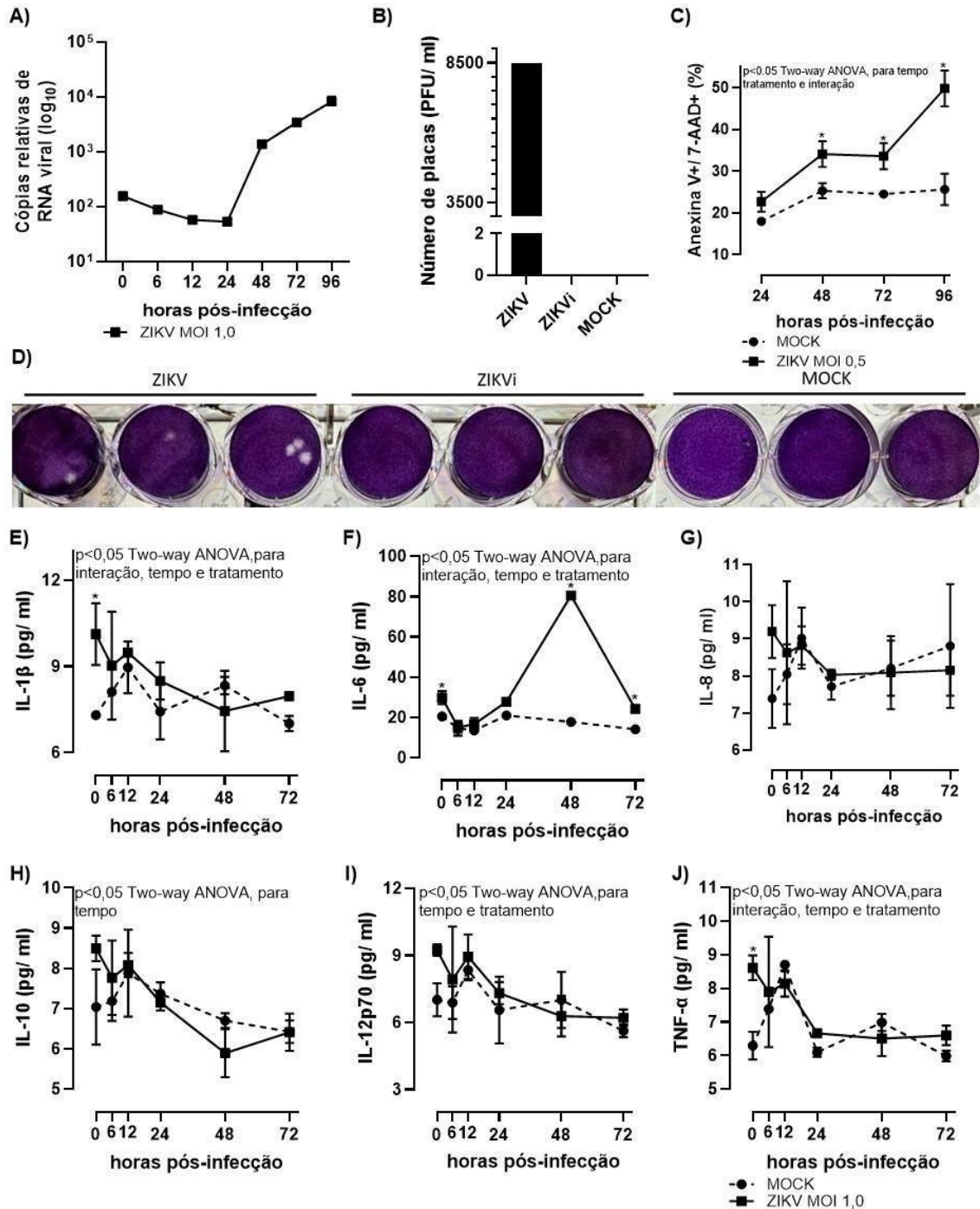
Legenda: A detecção e quantificação de citocinas e quimiocinas em amostras de LCR foi realizada através de ensaio Luminex, empregando-se o *Cytokine Human Magnetic 25-Plex Panel*, conforme as instruções do fabricante. O ensaio foi conduzido na rede de Plataforma Luminex da Fiocruz/ RJ. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney não pareado, para comparar variáveis contínuas. Os resultados foram expressos como diagramas de caixa, mostrando mediana, quartil superior e inferior, valores mínimo e máximo. Os *outliers* são representados por pontos fora do intervalo interquartil. Todos os valores de p foram bilaterais com um nível de significância de 0,05. Os cálculos foram realizados usando o software GraphPad Prism 7.

6.3 O ZIKV infecta células SH-SH5Y e induz apoptose e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias

Inicialmente, a infecção de células SH-SY5Y por ZIKV foi confirmada pela detecção e quantificação do RNA viral, extraído dos sobrenadantes de cultura obtidos em diferentes intervalos pós-infecção. Como mostra o gráfico 14 A, o aumento exponencial do número de cópias do RNA do ZIKV foi observado a partir de 24 hpi e atingiu o seu pico após 96 horas. Uma vez infectadas, estas células favoreceram a formação de novas partículas virais infecciosas, atingindo uma concentração de $8,5 \times 10^4$ PFU/ ml no intervalo de 72 hpi, conforme demonstrado em ensaio de placa (Gráfico 14 B). Para confirmar este resultado, um ensaio de placa também foi realizado a partir de sobrenadantes de cultura tratados com BPL, e como esperado, não foram observadas unidades formadoras de placa (Figura 14 B). Um dos efeitos da infecção foi o aumento no percentual de células anexina v 5⁺/ 7-aad⁺, sugerindo que o ZIKV induz à morte de células de linhagem neuronal que estão em desenvolvimento (Gráfico 14 C).

A produção de mediadores pró-inflamatórios também foi investigada. De acordo com o gráfico 14 E, o vírus induziu a produção de IL-6 com valores de $p < 0,05$ nos intervalos de 48 e 72 hpi. IL-1 β e TNF também apresentaram diferenças estatisticamente significativas no intervalo de 0 hpi, sugerindo que a ativação de moléculas pró-inflamatórias tem início poucos minutos após as células serem expostas ao vírus (Gráficos 14 D, I). IL-8, IL-10 e IL-12p70, por sua vez, apresentaram um perfil similar entre os grupos MOCK e ZIKV (Gráficos 14 F-H).

Figura 14- Caracterização da infecção de células SH-SY5Y por ZIKV



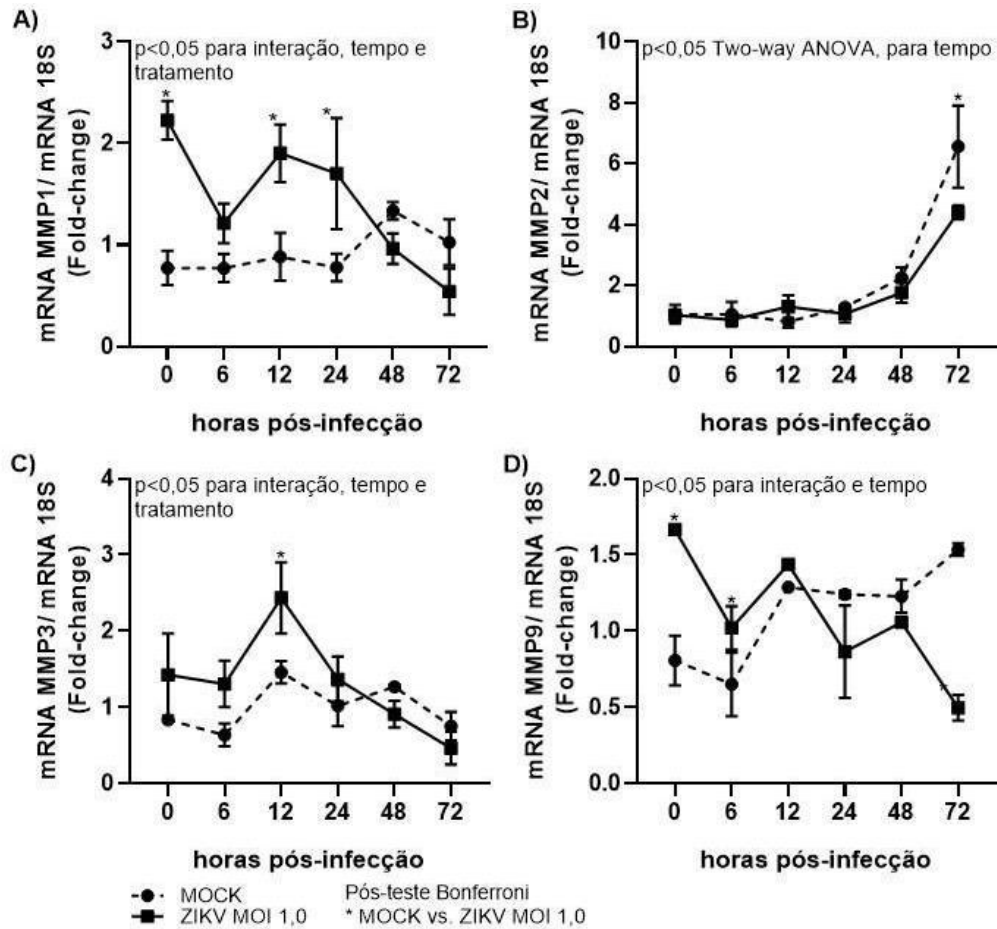
Fonte: A autora.

Legenda: Células SH-SY5Y por ZIKV MOI 1,0. A) quantificação da carga viral por RT-PCR em diferentes intervalos pós-infecção e B) do número de partículas virais, através de ensaio de placa (72 hpi). O tratamento com BPL foi utilizado para inativação viral e realização do ensaio de placa. C) As células SH-SY5Y foram coletadas nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 hpi, marcadas com anexina v/ 7-aad e analisadas por citometria de fluxo. E-J) representam a quantificação de citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes de cultura obtidos nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hpi utilizando o kit *Human Inflammatory Cytokine CBA*, de acordo com as instruções do fabricante. As análises estatísticas: Two-way anova e pós-teste de Bonferroni. * p< 0,05 para comparação entre grupo MOCK e ZIKV.

6.4 O ZIKV modula a expressão de MMPs em células SH-SY5Y

As análises da expressão das MMPs -1, -2, -3 e -9 foram conduzidas em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV. De acordo com nossos achados, quando infectadas, estas células apresentam níveis de expressão de MMP-2 significativamente diminuídos (Gráfico 15 B). Esta MMP é crucial para a proliferação e diferenciação de células progenitoras neuronais quando expressas em níveis basais. Além disso, a infecção por ZIKV aumentou significativamente a expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-9, também requeridas para angiogênese, neurogênese, entre outros processos relacionados ao desenvolvimento e manutenção do SNC (Gráficos 15 A, C-D). Uma desregulação na expressão destas proteínas, geralmente está relacionada à resposta pró-inflamatória que ocorre dentro do SNC, principalmente na presença de IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF e pode atrapalhar o desenvolvimento neurogênico. A literatura já tem demonstrado que o ZIKV prejudica o processo de neurogênese através de diversos mecanismos, porém este é o primeiro trabalho que aponta a possível participação das MMPs -1, -2, -3, -9, neste processo.

Figura 15- Expressão de MMPs em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV



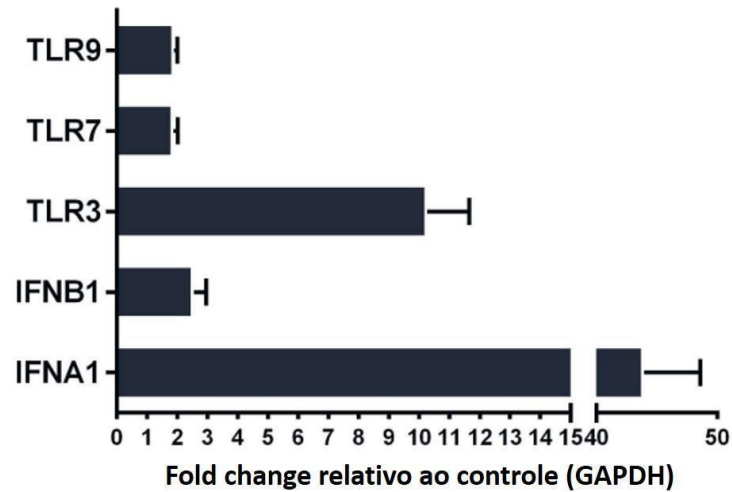
Fonte: A autora.

Legenda: Os gráficos apresentam o perfil de expressão de MMPs em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hpi. Os cDNAs foram confeccionados a partir do RNA celular total extraído dos grupos MOCK e ZIKV MOI 1,0. A RT-PCR foi realizada utilizando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix e primers específicos para os genes alvo (MMP-1, -2, -3 e -9) e endógeno (18S). O *fold-change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_t$ tomando o grupo controle como referência e foi considerado significativo quando >2 . Análises estatísticas: Two-way anova e pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ para comparação entre grupo MOCK vs. ZIKV.

6.5 O ZIKV altera a expressão de *TLR-3*, *IFNA1* e *IFNB1* em células SH-SY5Y

A expressão dos transcritos de *TLR-3*, *TLR-7* e *TLR-9*, e de *IFNA1* e *IFNB1*, moléculas chave para a ativação da resposta imune inata contra vírus de RNA, também foi avaliada neste trabalho. Notadamente, a infecção das células SH-SY5Y com ZIKV aumentou significativamente a expressão de *TLR-3* (Figura 16). A expressão dos TLRs -7 e -9, no entanto, foi menos evidente (Figura 16). Em relação aos transcritos de *IFNA1* e *IFNB1*, a infecção *in vitro* modulou positivamente sua expressão, ressaltando a importância destas citocinas para a construção da resposta imune mediada pelo ZIKV no SNC (Figura 16).

Figura 16- Expressão de TLRs e IFN-I (α/β) em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV



Fonte: Lima et al. (2019, publicação nossa).

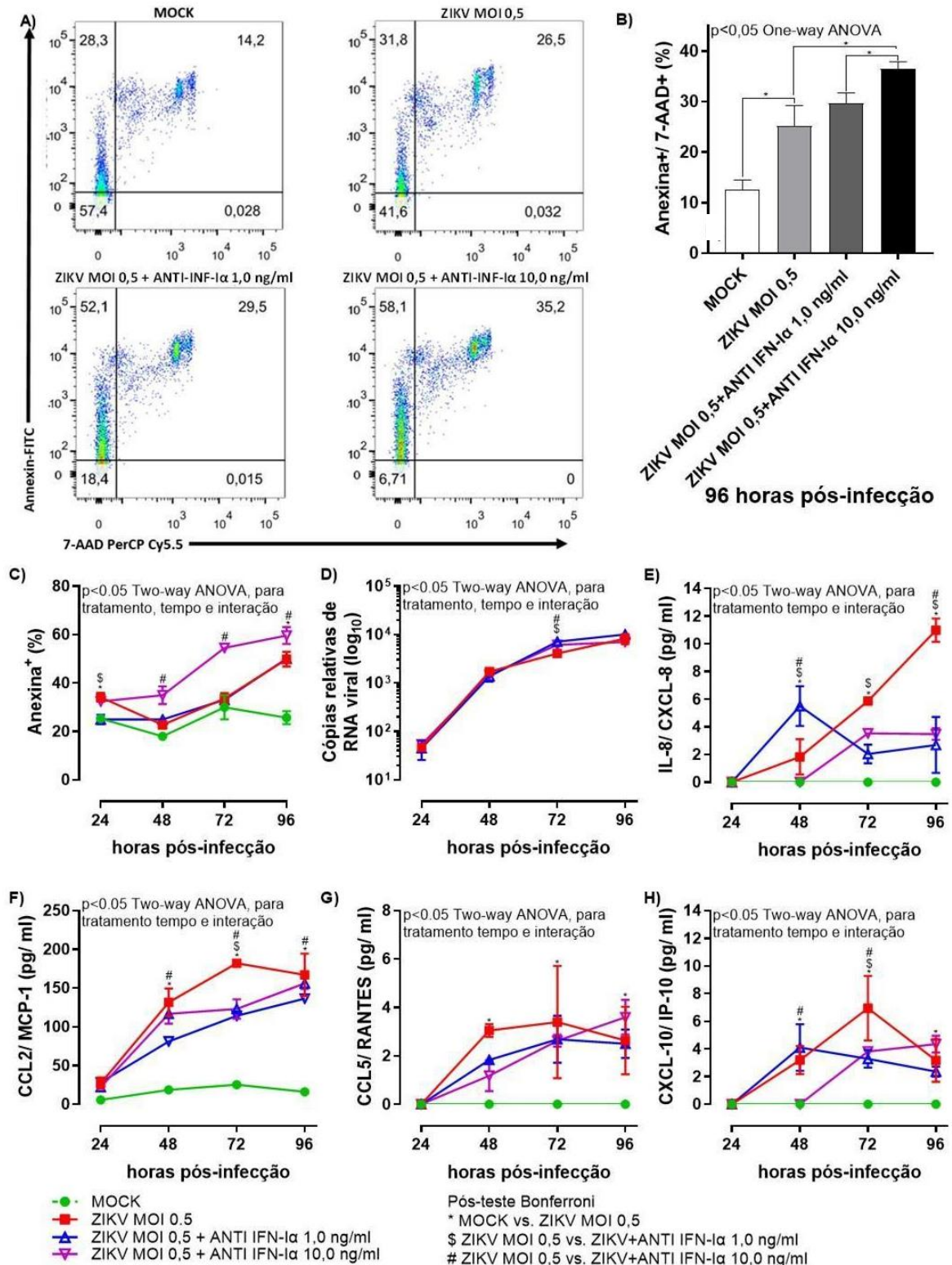
Legenda: Representação da expressão dos transcritos de *TLR-3*, *TLR-7*, *TLR-9*, *IFNA1* e *IFNB1* em células SH-SY5Y, após 48 horas de infecção por ZIKV MOI 1,0. O ensaio foi realizado pelo uso do kit TaqMan Universal PCR Master Mix e primers e sondas específicas. A expressão gênica foi normalizada pelo gene endógeno (*GAPDH*). O *fold-change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_t$ tomando o grupo controle como referência e foi considerado significativo quando >2 . Os dados são representados pelos valores da média \pm DP, calculados a partir de triplicatas biológicas.

6.6 A inibição de IFN- α modula a resposta de células SH-SY5Y frente à infecção por ZIKV

Este trabalho avaliou de forma mais robusta a participação do IFN-I no contexto da neuroinflamação mediada pelo ZIKV *in vitro*. A abordagem por nós utilizada foi a inibição parcial da via do IFN-I, através do uso de anticorpo específico para as moléculas de IFN- α . De acordo com os resultados, a resposta de IFN-I parece influenciar tanto na capacidade de replicação do vírus, quanto na indução de vias apoptóticas e inflamatórias (Figura 17). Tal sugestão ocorre, uma vez que o tratamento com duas concentrações distintas de anti-IFN- α , promoveu um aumento estatisticamente significativo no percentual de células mortas, quando comparados ao grupo ZIKV (Histograma A e Gráficos 17 B-C). Apesar disso, a apoptose não parece ser um processo exclusivamente IFN dependente, já que o grupo experimental ZIKV apresentou valores de p significativos no que diz respeito ao número de células anexina v+/ 7-aad+ quando comparado ao MOCK (Histograma A e Gráficos 17 B-C). Em relação a carga viral, também foi mais acentuada nos grupos ZIKV MOI 0,5+ANTI-INF-I 1,0 ng/ml e ZIKV MOI 0,5+ANTI-INF-I 10,0 ng/ml em relação ao grupo ZIKV ($p < 0,05$) (Gráfico 16 D). Em comparação ao grupo MOCK, a infecção induziu o aumento dos níveis das quimiocinas CXCL-8/ IL-8, CXCL-10/ IP-

10, CCL-2/ MCP-1 e CCL-5/ RANTES detectadas no sobrenadante de cultura, com valores de $p < 0,05$ (Gráficos 17 E-H). A inibição de IFN-I por sua vez, levou a uma redução dos níveis de CXCL-8/ IL-8, CXCL-10/ IP-10, e CCL-2/ MCP-1 (Figura 17 E-G). A modulação da resposta de quimiocinas é esperada, uma vez que a expressão de seus genes específicos depende em parte da sinalização de IFN-I. Estes dados corroboram com o perfil imune extraído das amostras de LCR de crianças com microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV e reforça o possível envolvimento dessas quimiocinas com os mecanismos fisiopatológicos da síndrome.

Figura 17- Efeitos da inibição do IFN- α em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV



Fonte: A autora.

Legenda: Os dot plots e gráficos são representativos das alterações apresentadas por células SH-SY5Y após infecção por ZIKV MOI 0,5 e inibição parcial de IFN- α , nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 hpi. A) os dot plots mostram a taxa de apoptose das células pela marcação com anexina v-FITC/ 7-aad-PerCPCy5.5, de modo que o quadrante (Q) 1 representa células anexina v-/ 7-aad+, Q2 as células em apoptose ou necrose tardia, pela dupla marcação positiva, Q3 representa células vivas (anexina v/ 7-aad+) e Q4 refere-se às células em processo apoptótico inicial (anexina v+ / 7-aad+); B) o

gráfico de barras mostra o percentual de células anexina v+/ 7-aad+ em 96 hpi; e C) o gráfico de pontos refere-se ao percentual de células anexina positivas considerando os diferentes intervalos pós-infecção; D) quantificação da carga viral por RT-qPCR; e E-H) dosagem de quimiocinas por CBA nos sobrenadantes de cultura. Análises estatísticas: Two-way anova e pós-teste de Bonferroni. sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas valores de $p < 0,05$. Os dados são representados pelos valores da média \pm DP, calculados a partir de triplicatas biológicas.

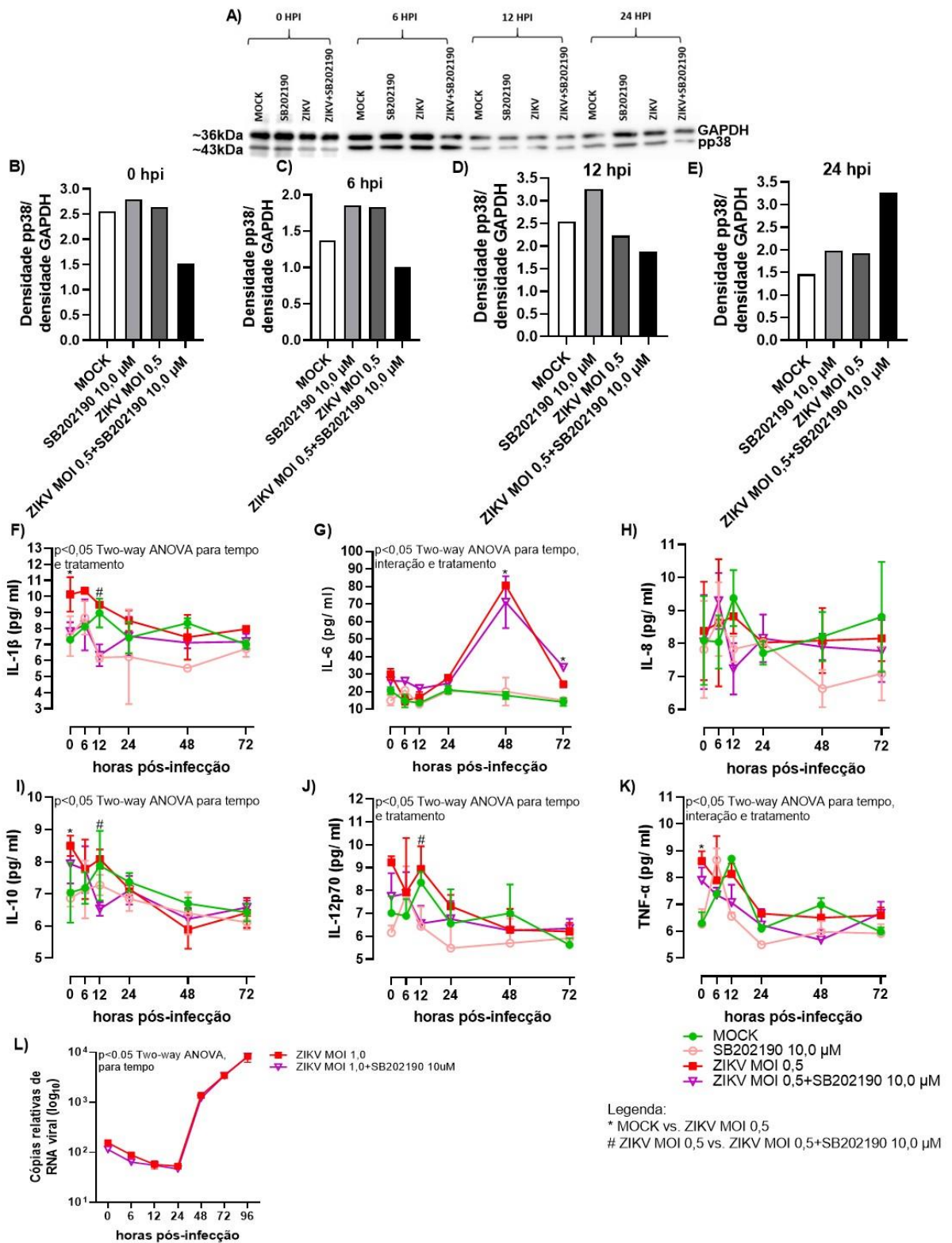
6.7 A resposta pró-inflamatória de células SH-SY5Y infectadas por ZIKV é parcialmente dependente da fosforilação de p38

A cinética da fosforilação de p38 em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV foi acessada através de ensaio de *western blot* (Figura 18 A, Gráficos B-E). Os resultados aqui obtidos sugerem fortemente que a infecção por ZIKV induz a fosforilação de p38, uma vez que a densidade de pp38 relativa ao controle endógeno (GAPDH) encontra-se aumentada nos intervalos de 0, 6 e 24 hpi quando comparado ao MOCK (Gráficos 18 B, C e E). Confirmando estes achados, a associação do SB202190 (inibidor da fosforilação de p38) com a infecção por ZIKV, levou a redução destes parâmetros (Figura A e Gráficos B-D).

Para verificar os efeitos da inibição da fosforilação de p38 na resposta inflamatória desencadeada pelo vírus nestas células, citocinas pró-inflamatórias foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura sob diferentes condições. Interessantemente, assim como ocorre para a fosforilação de p38, uma diminuição significativa de IL-1 β , IL-10 e IL-12p70 foi identificada no grupo ZIKV MOI 0,5+SB202190 10,0 μ M em relação ao grupo ZIKV MOI 0,5, mais especificamente no intervalo de 12 hpi (Gráficos F, I e J). Além disso, uma tímida redução na quantificação de TNF também foi constatada entre os grupos, porém com valores de $p > 0,05$ (Gráfico 18 K). Considerando os grupos MOCK *versus* ZIKV, a infecção induziu o aumento significativo de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF em diferentes intervalos de análise (Gráficos F, G, I e K).

Por fim, um ensaio de RT-qPCR foi realizado para quantificação da carga viral nos sobrenadantes de cultura infectadas, no entanto, diferenças estatisticamente significativas não foram encontradas (Figura 18 L). Juntos, estes dados reforçam a hipótese de que a ativação de p38 é crucial para a modulação da resposta pró-inflamatória decorrente da infecção de células SH-SY5Y por ZIKV, sendo responsável, ao menos em parte, pela produção de mediadores químicos da inflamação.

Figura 18- Inibição de p38 e a modulação da resposta imune em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV



Fonte: A autora.

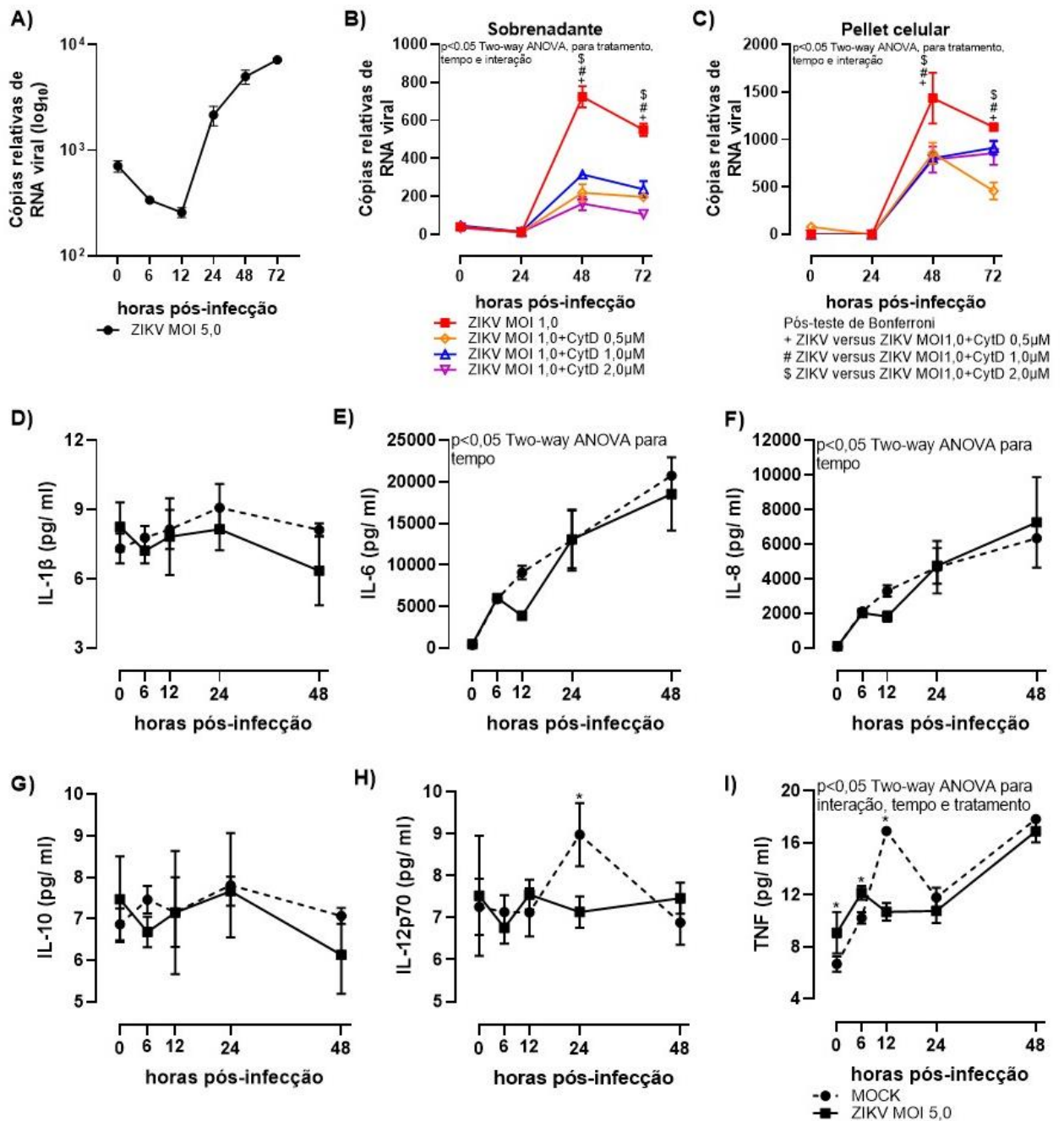
Legenda: Células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI = 0,5) e tratadas com SB202190 [10,0 μM] foram coletadas em diferentes intervalos (0, 6, 12 e 24 hpi) e analisadas para a fosforilação de p38MAPK por Western blot (A-E). O GAPDH foi utilizado como controle endógeno do experimento. A

quantificação de citocinas pró-inflamatórias (F-K) e do número de cópias de RNA (L), foi acessada nos sobrenadantes de cultura por ensaio de CBA e RT-qPCR, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. As análises estatísticas: Two-way anova e pós-teste de Bonferroni, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas valores de $p < 0,05$. Os dados são representados pelos valores da média \pm DP, calculados a partir de triplicatas biológicas. MOCK: células cultivadas em meio MEM/F12; SB202190: células tratadas com SB202190, mas não infectadas com ZIKV; ZIKV MOI 1,0: células infectadas com ZIKV (MOI 1,0); ZIKV+SB202190: células tratadas com SB202190 e infectadas com ZIKV MOI=1,0.

6.8 O citoesqueleto de actina facilita a replicação do ZIKV em HBMECs que produzem citocinas pró-inflamatórias

O presente trabalho também se propôs a analisar os efeitos da infecção de HBMECs por ZIKV. A suscetibilidade e permissividade das células endoteliais ao vírus foi analisada pela quantificação do RNA viral extraído dos sobrenadantes de cultura obtidos em diferentes intervalos pós-infecção. A partir de 12 hpi foi observado o aumento exponencial no número de cópias de RNA do ZIKV, confirmando assim a capacidade do vírus em infectar e se replicar nestas células (Gráfico 19 A). De acordo com os gráficos 19 B e C, a replicação viral parece estar relacionada a integridade do citoesqueleto de actina, uma vez que o tratamento com diferentes concentrações de Citocalasina D, um inibidor da formação das fibras de actina, reduziu significativamente a carga viral quantificada tanto nos sobrenadantes de cultura, quanto nos extratos celulares ($p < 0,05$). Após confirmação da infecção, o perfil de citocinas pró-inflamatórias foi avaliado (Gráfico D-I). Valor de p significativo foi obtido para TNF, que estava aumentado nos sobrenadantes do grupo ZIKV em comparação ao MOCK (Gráfico 19 I). Contrariamente, um aumento na produção de IL-12p70 ($p < 0,05$) foi identificado no grupo MOCK em relação ao ZIKV, no intervalo de análise de 24h (Gráfico 19 H). IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 também foram detectadas, porém sem significância estatística entre os grupos (Gráfico 19 D-G). A detecção de TNF gera fortes indícios da participação das células da BHE para a amplificação da resposta pró-inflamatória que ocorre dentro do SNC frente à infecção por ZIKV. Além disso, as HBMECs podem ser a porta de entrada para o vírus no SNC, já que tem como uma de suas funções principais controlar a troca de moléculas entre sangue e cérebro. Porém, análises mais detalhadas precisam ser realizadas para confirmar esses dados.

Figura 19- Caracterização da infecção de HBMECs por ZIKV



Fonte: A autora.

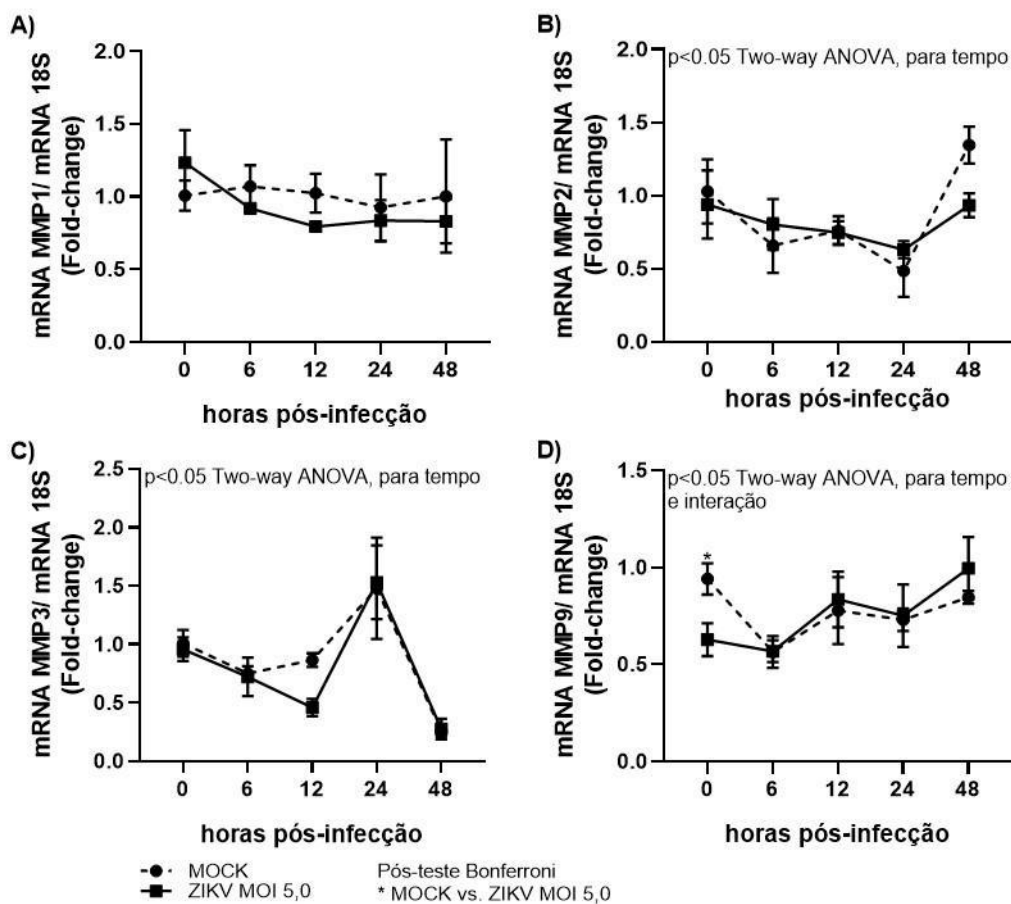
Legenda: HBMECs infectadas por ZIKV. A) RT-PCR para quantificação da carga viral em sobrenadante de HBMECs infectadas por ZIKV (MOI=5,0); B-C) e após o tratamento com Cyt D [0,5, 1,0 e 2,0 μ M], em diferentes intervalos pós-infecção. Os gráficos D-I) são representativos da quantificação de citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes de cultura. Análises estatísticas: Two-way anova e pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ para comparação entre grupo MOCK e ZIKV.

6.9 Expressão de MMPs em HBMECs infectadas com ZIKV

Dentre as diferentes atividades exercidas pelo TNF, a ativação de MMPs é bastante estudada no contexto da inflamação induzida por vírus neurotrópicos. Uma

vez que a infecção de HBMECs por ZIKV induziu a produção desta citocina, nós avaliamos o perfil de expressão das MMPs -1, -2, -3 e -9 nestas células. Mediante à infecção, a expressão de MMP-9 foi significativamente reduzida no primeiro intervalo de análise (Gráfico 20 D). Os transcritos de MMP-2 e MMP-3 nas HBMECs infectadas também se apresentaram discretamente reduzidos nos intervalos de 48 hpi e 12 hpi, respectivamente, porém com valores de $p > 0,05$ (Gráficos B-C). Em relação a expressão de MMP-1, nenhuma alteração foi observada entre os grupos (Gráfico 20 A).

Figura 20- Expressão de MMPs em HBMECs infectadas com ZIKV



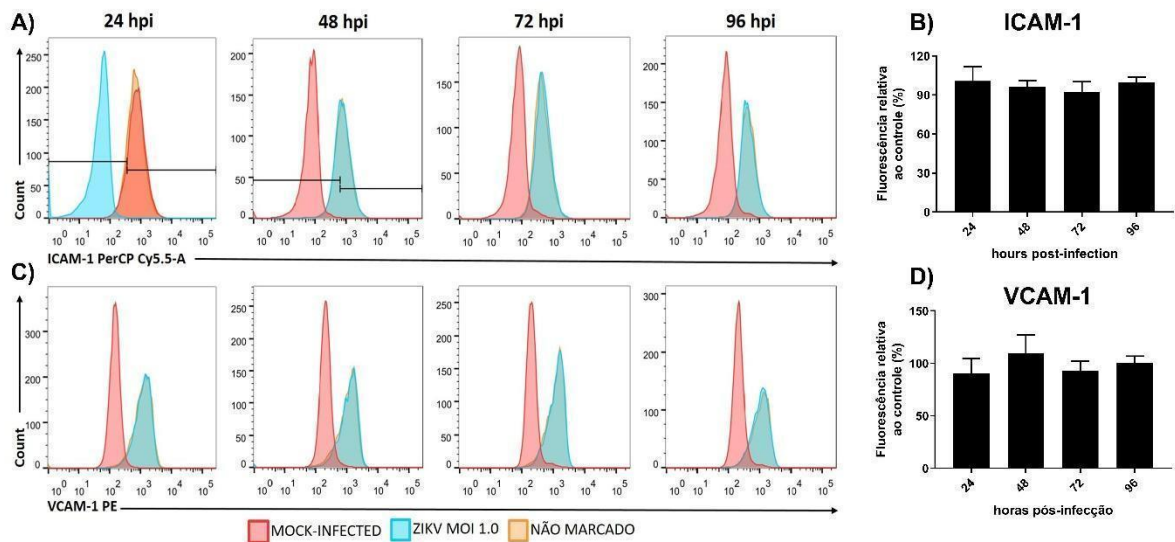
Fonte: A autora.

Legenda: Expressão de MMPs -1, -2, -3 e -9 em HBMECs infectadas com ZIKV (MOI = 5,0) nos intervalos de 0, 6, 12, 24 e 48 hpi. O *fold-change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_t$ tomando o grupo controle como referência e foi considerado significativo quando >2 . Análises estatísticas: Two-way anova e pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ entre os grupos MOCK vs. ZIKV.

6.10 Expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECs

A expressão de ICAM-1 e VCAM-1 também é diretamente influenciada pela liberação de mediadores inflamatórios. A figura 21 retrata análises da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECs infectadas por ZIKV, considerando a média de intensidade de fluorescência (MFI) em relação ao controle negativo (MOCK). Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas entre os grupos MOCK e ZIKV, para ambos os receptores (Figura 21). Um discreto aumento de VCAM-1 pode ser notado no intervalo de 48 hpi em relação aos outros intervalos de análise, porém com valor de $p > 0,05$ (Gráfico 21 D).

Figura 21- Influência da infecção por ZIKV na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECS



Fonte: A autora.

Legenda: HBMECs infectadas com ZIKV (MOI=1,0). Os histogramas retratam a marcação de ICAM-1 (A) e VCAM-1 (C), enquanto os gráficos de barra são representativos da MFI em relação ao MOCK. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, em HBMECs obtidas em diferentes intervalos pós-infecção (24, 48, 72 e 96 h). Análises estatísticas: Ordinary one-way anova, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas valores de $p < 0,05$.

Muitas variáveis podem estar associadas a esses resultados obtidos nos ensaios de infecção de HBMECs por ZIKV e, portanto, serão discutidas a seguir. De antemão, o uso de controles positivos (células tratadas com TNF e LPS, por exemplo), aumento da MOI e ensaios de coinfeção de células SH-SY5Y e HBMECs, talvez possam contribuir para uma ativação mais robusta da resposta pró-inflamatória e assim gerar resultados com maior respaldo científico.

7. DISCUSSÃO

A neuroinflamação parece ser um dos efeitos compulsórios da infecção por ZIKV, seja ela *in vitro* ou *in vivo* (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; LIMA et al., 2019; MLADINICH; SCHWEDES; MACKOW, 2017). A perfeita regulação desta resposta engloba uma série de moléculas, vias e células imunes residentes do SNC, que interagem com a BHE e com células imunes periféricas (KLEIN et al., 2019; O'CALLAGHAN; MILLER, 2019). A intensidade com que a resposta inflamatória acontece é determinante para a recuperação do estado homeostático pós injúria, como também para a promoção de uma série de eventos que podem prejudicar a estrutura e o funcionamento do SNC (SHABAB et al., 2017)

A caracterização imune de amostras de LCR oriundas de RNs com microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV e controle saudável foi realizada. Todos os LCRs foram coletados em RNs com até quatro semanas de vida, cuja infecção foi confirmada pela detecção de IgM anti-Zika (96%) na maioria das amostras, enquanto que em apenas 4 (4%) delas foi possível detectar o RNA viral por RT-qPCR. Por se tratar de um estudo retrospectivo, o período gestacional em que a infecção ocorreu não pôde ser definido. Por outro lado, associando os resultados laboratoriais, ao fato de que mais de 60% dos casos de microcefalia são observados em RNs cujas mães foram expostas ao ZIKV entre o primeiro e segundo trimestres da gravidez, acredita-se que a infecção dos indivíduos incluídos neste estudo tenha ocorrido no mesmo período (AZAMOR et al., 2021; MUSSO; KO; BAUD, 2019). De acordo com Camacho-Zavala et al., (2021), a presença de sintomas da infecção por ZIKV em gestantes não é um fator predeterminante para o desenvolvimento da síndrome, o que pode justificar o alto percentual de mães assintomáticas no grupo microcefalia.

As análises imunológicas revelaram valores significativamente aumentados de IFN- α , CXCL-9/ MIG e CXCL-10/ IP-10 no grupo microcefalia quando comparado ao grupo controle saudável. IL-1 β , IL1-RA, IL-6 e CXCL-8/ IL-8 encontraram-se elevados, mas sem significância estatística entre os grupos. A produção desses mediadores geralmente está associada a um processo pró-inflamatório agudo, iniciado logo após o vírus ser reconhecido pelo organismo, como demonstrado por diferentes trabalhos (HAMEL et al., 2015; LIMA et al., 2019; SCREATON; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA, 2018). Interessantemente, gestantes infectadas

por ZIKV apresentam um perfil imune similar àquele obtido por nós nas amostras de LCR, com elevação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-1RA, e IL-2R), pró-inflamatórias (IL-6, IFN- α , IFN- γ e IL-17) e quimiocinas CXCL-8/ IL-8 e CXCL-9/ MIG (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021). O que mais chamou atenção foi o aumento significativo de CXCL-10/ IP-10 constatada em gestantes infectadas quando comparadas às gestantes sem ZIKV (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021).

Corroborando com esses dados, a regulação positiva de CXCL-10/ IP-10 e de outros genes relacionados à via do IFN-I também foi confirmada em tecidos placentários de casos da SCZ (AZAMOR et al., 2021). Estes dados indicam o desencadeamento de uma resposta imune regulatória na interface materno-fetal que poderia controlar a infecção e assim limitar o acesso do vírus ao SNC em formação (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; LIMA et al., 2019; NASCIMENTO-CARVALHO et al., 2021). No entanto, a persistência dessas proteínas em amostras de LCR obtidas com até 29 dias após o nascimento, geram indícios da conversão imune a um estado inflamatório crônico e da sua possível atuação no desenvolvimento das alterações congênitas provocadas pelo ZIKV (ESTÉVEZ-HERRERA et al., 2021; LIANG et al., 2019; LIMA et al., 2019).

Condições clínicas muito similares àquelas apresentadas em RNs com a SCZ, são frequentemente observadas e caracterizam um grupo heterogêneo de doenças monogênicas conhecidas como Interferonopatias do tipo I, ou Síndrome de Aicardi-Goutières (CROW; MANEL, 2015; FREITAS et al., 2020). Entre as principais alterações neurológicas, estão calcificações intracranianas, alterações na camada branca e atrofia cerebral, associadas à altas concentrações de IFN- α no LCR (CROW; MANEL, 2015; GOUTIÈRES, 2005). Além disso, a ativação excessiva de IFN é um precedente para anormalidades na barreira materno-fetal, para a restrição do crescimento, hipóxia fetal e abortos espontâneos (YOCKEY et al., 2018).

Segundo Azamor et al., (2021), o desequilíbrio inflamatório observado na infecção congênita por ZIKV é determinado pela presença de SNPs nos genes de IFNAR1. Ainda de acordo com os autores, o genótipo CG/CC de IFNAR1 identificado em amostras de placenta de casos da SCZ, estaria associado à produção aumentada de IFN-I e diminuída de IFN-III(λ) (AZAMOR et al., 2021). Este último atua como antagonista do IFN-I, regulando assim a sua expressão (AZAMOR et al., 2021). A desarmonia na resposta dos IFNs levaria à ativação excessiva de genes pró-inflamatórios como CXCL-8/ IL-8, CXCL-9/ MIG, CXCL-10/ IP10 e MIP-1 α ,

que podem contribuir para a progressão dos quadros graves da infecção, como por exemplo, a microcefalia (AZAMOR et al., 2021; CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; LIMA et al., 2019).

Em infecções provocadas por outros Flavivírus, uma resposta pró-inflamatória robusta está associada à neuroinvasão e às alterações na permeabilidade de BHE (AL-OBAIDI et al., 2018; CHONG et al., 2019; NAVECA et al., 2018). O tropismo do ZIKV por células residentes da unidade neurovascular é um fenômeno já bem estabelecido (ALIMONTI et al., 2018; FERRARIS et al., 2019; LIMA et al., 2019; PAPA et al., 2017; VAN DEN POL et al., 2017). Redução da proliferação celular, diferenciação prematura e aumento de apoptose, são alguns dos efeitos citopáticos do ZIKV observados em células precursoras neuronais em diferentes estágios de diferenciação (DE MENDONÇA-VIEIRA et al., 2021; FERRARIS et al., 2019; GABRIEL et al., 2017; MINER; DIAMOND, 2017). Possivelmente, estes mecanismos estão intimamente relacionados à diminuição do perímetro cefálico, hipoplasia do tronco cerebral e do cerebelo, retardo do crescimento, dentre outras condições clínicas da SCZ (ESTÉVEZ-HERRERA et al., 2021; FERRARIS et al., 2019). A influência da resposta inflamatória para a ativação e/ ou potencialização desses mecanismos, no entanto, ainda não é bem compreendida.

Corroborando com esses dados, nós observamos que o ZIKV infecta células SH-SY5Y de forma efetiva e leva ao aumento de morte celular e da produção de IL-1 β , IL-6 e TNF. Como mostrado por nós e outros, uma ampla gama de mediadores inflamatórios em sobrenadantes de células de linhagem neuronal no contexto da infecção por ZIKV já foi identificada (FERRARIS et al., 2019; LIMA et al., 2019; LONDONO-RENTERIA et al., 2017; ZHU et al., 2017). Déficits neurológicos e danos cerebrais têm sido frequentemente associados à regulação positiva de MMPs em decorrência da produção local de IL-1 β , IL-6, TNF, CXCL-8/ IL-8 e CCL-5/ RANTES (AL-OBAIDI et al., 2018; ROE et al., 2012; ROSENBERG, 2002; VICTORIA et al., 2020). Diante disso, nós avaliamos se a inflamação mediada por ZIKV em células SH-SY5Y modifica a expressão de MMPs importantes ao desenvolvimento e manutenção do SNC (AL-OBAIDI et al., 2018; VICTORIA et al., 2020).

Curiosamente, o ZIKV promoveu a redução na expressão de MMP-2, enquanto regulou positivamente as MMPs -1, -3 e -9. Um desequilíbrio na atividade dessas moléculas está associado a degradação de matriz extracelular, perda de integridade de BHE e potencialização da neuroinflamação (AL-OBAIDI et al., 2018;

VICTORIA et al., 2020; YANG; HILL; ROSENBERG, 2011). No contexto da infecção por ZIKV, esta combinação pode contribuir para a redução da proliferação de células neuronais e astrócitos, aceleração da diferenciação prematura, desregulação dos processos apoptóticos e de remodelação sináptica, resultando em neurogênese prejudicada (CHOPRA; OVERALL; DUFOUR, 2019; VICTORIA et al., 2020; ZHOU et al., 2014). Todos esses eventos já foram associados à infecção de células neuronais por ZIKV, porém esse é o primeiro trabalho que mostra a possível participação das MMPs na imunopatologia da SCZ (DE MENDONÇA-VIEIRA et al., 2021; FERRARIS et al., 2019a; GABRIEL et al., 2017; MINER; DIAMOND, 2017).

Estudos prévios têm demonstrado que o ZIKV e outros Flavivírus ativam os TLRs 3 e 7, e assim estimulam uma potente resposta antiviral inflamatória (DANG et al., 2016; HAMEL et al., 2015). Conforme mostrado neste trabalho, as células SH-SY5Y apresentaram maior expressão dos transcritos de TLR3 quando infectadas por ZIKV. A regulação positiva de TLR3 já foi associada à cepa Asiática do ZIKV, enquanto a cepa Africana parece induzir mais TLR7 (FERRARIS et al., 2019). Por ser bastante expresso nos estágios iniciais do desenvolvimento cerebral e diminuir à medida que as células vão amadurecendo, o TLR3 deve ser considerado uma molécula chave para a neuroinflamação observada em fetos e RNs infectados por ZIKV (DANG et al., 2016; TSAI et al., 2009). Associado a isso, este PRR já foi previamente sugerido na literatura como um dos principais receptores associados à ativação da imunidade anti-ZIKV, e, por alterar a expressão de genes e quimiocinas relacionados ao neurodesenvolvimento e ativação de vias pró-apoptóticas (DANG et al., 2016; OJHA et al., 2018).

Um aumento dos transcritos de *IFNA1* e *IFNB1* também foi observado mediante a infecção de células SH-SY5Y por ZIKV. Isso era esperado, uma vez que altas concentrações de IFN- α foram detectadas em LCR de RNs com microcefalia induzida pelo vírus, conforme mostrado anteriormente neste trabalho. Diferentes aspectos da participação do IFN-I vêm sendo largamente explorados em modelos de infecção por ZIKV *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (AZAMOR et al., 2021; BOWEN et al., 2017; FERRARIS et al., 2019; GRANT et al., 2016; HAMEL et al., 2015; LIMA et al., 2019; TRIPATHI et al., 2017). É indiscutível a primordialidade da sua ativação para que o organismo consiga debelar a infecção (BOWEN et al., 2017; HAMEL et al., 2015; NGAN et al., 2019). O processo evolutivo viral, no entanto, favoreceu o desenvolvimento de diferentes estratégias de evasão do sistema imune, que

favorecem a permanência do vírus no hospedeiro, a produção de maior carga viral e ao desenvolvimento de quadros graves da infecção (BOWEN et al., 2017; GRANT et al., 2016; LI et al., 2019; NGAN et al., 2019; WU et al., 2017).

A cepa brasileira ZIKV PE243, isolada de uma área com alta endemicidade durante a epidemia de ZIKV no Brasil, – utilizada por nós neste trabalho –, por exemplo, foi associada à uma ativação menos robusta da resposta inflamatória (LIMA et al., 2019). Por outro lado, ela apresenta maior capacidade de evasão da resposta de IFN e da desregulação de outros processos celulares do que a cepa ZIKV/ Camboja (LIMA et al., 2019). Diferenças acerca da ativação da resposta imune inata e da fisiopatologia da infecção *in vitro* e *in vivo* entre as cepas Asiática e Africana do ZIKV já foi relatada por outros autores (DOWALL et al., 2017; ESSER-NOBIS et al., 2019). Estes mecanismos podem explicar, ao menos em parte, o fato de a maior incidência de microcefalia ter sido identificada pela primeira vez no nordeste do Brasil, conforme sugerido por Lima et al., (2019).

Nesse contexto, nós avaliamos como as células SH-SY5Y infectadas por ZIKV se comportariam frente à inibição parcial de IFN-I. Corroborando com a literatura, o tratamento com anti-IFN-I α modulou de forma significativa a resposta celular mediante à infecção, ocasionando o aumento da carga viral e do percentual de células apoptóticas. Além disso, a redução de CXCL-8/ IL-8, CXCL-10/ IP-10, e CCL-2/ MCP-1 também foi identificada em comparação ao grupo ZIKV (CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; LIMA et al., 2019; NAVECA et al., 2018). A partir da ligação com CXCR3, um receptor expresso por células imunes, epiteliais e endoteliais, CXCL-10/ IP-10 promove a quimiotaxia de linfócitos para os locais de injúria e ativa vias pró-apoptóticas (DIOP et al., 2018; SIDAHMED et al., 2012). CXCL-8/ IL-8, por sua vez, caracteriza-se como uma citocina pró-inflamatória de fase aguda com propriedades quimiotáticas (KOO et al., 2006; SINGH et al., 2020). Ativação de MMPs, quebra de barreira endotelial e migração de neutrófilos e monócitos são decorrentes da produção de CXCL-8/ IL-8 em infecções por outros Flavivírus (BETAKOVA et al., 2017; JOVANOVIĆ et al., 2010; ROE et al., 2012).

Nas infecções por DENV, por exemplo, CXCL-10 está associada ao desenvolvimento de febre hemorrágica da DENV e de quadros neurológicos como paralisia (FALLAHI; ELIA, 2016; NIRANJAN; MUTHUKUMARAVEL; JAMBULINGAM, 2019). Nestes casos, há um processo neuroinflamatório caracterizado por altas concentrações desta quimiocina e infiltrado de células TCD8⁺

na unidade neurovascular (FALLAHI; ELIA, 2016; NIRANJAN; MUTHUKUMARAVEL; JAMBULINGAM, 2019; SIDAHMED et al., 2012). Mais recentemente, CXCL-10/ IP-10 foi apontada como um biomarcador importante da Covid-19 moderada (TRIPATHY et al., 2021). Junto a CXCL-9/ MIG, CXCL-8/ IL-8 e CCL-2/ MCP-1, atua como fator predeterminante na patogenicidade e mortalidade da infecção por diferentes cepas do vírus Influenza A humano (BETAKOVA et al., 2017). Logo, muitas das alterações que ocorrem à níveis moleculares, tais como parada do ciclo celular, aumento da expressão de caspases efetoras da apoptose (3 e 7) e ativação de MMPs, observadas em células da unidade neurovascular infectadas por ZIKV, estão possivelmente ligadas à atividade destas quimiocinas (DIOP et al., 2018; FERRARIS et al., 2019; LIMA et al., 2019).

A via de MAPKp38 é estimulada por uma variedade de vírus (KUMAR et al., 2018b; ZHU et al., 2017). Sua ativação é requerida para o controle da replicação viral através da indução de genes relacionados à resposta de IFN e de citocinas (KUMAR et al., 2018b; WANG et al., 2022). Aqui, identificamos que a resposta imune mediada por ZIKV em células SH-SY5Y conduz à ativação de p38, uma vez que houve aumento na fosforilação desta proteína nos intervalos 0, 6 e 24 hpi quando comparada ao MOCK. Para confirmar estes resultados, a inibição de p38 junto à infecção, promoveu uma redução significativa da sua expressão, como também dos níveis de IL-1 β , IL-10, IL-12p70 ($p < 0,05$) e IL-6 ($p > 0,05$) quantificados em sobrenadantes das culturas celulares. Corroborando com Zhu et al., (2017), e Khaiboullina et al., (2019), os dados aqui reunidos reforçam o papel central da via de MAPK p38 no estabelecimento da inflamação induzida por ZIKV em células de linhagem humana. A quantificação do RNA do ZIKV, no entanto, não foi alterada entre os grupos, o que pode estar relacionado ao fato de que alguns vírus utilizam a via de MAPK p38 para manipular as funções celulares e favorecer a sua replicação (KUMAR et al., 2018b; WANG et al., 2022). Estudos que avaliem de forma mais abrangente a interação ZIKV-MAPKp38 precisam ser realizados.

No que diz respeito à infecção de células neuronais, os dados apresentados até aqui, indicam uma correlação entre a resposta neuroinflamatória e as incapacidades neurológicas que abrangem a SCZ. A BHE exerce uma função reguladora importante na resposta inflamatória do SNC, devido a sua interação com células neurais e imunes, além da liberação de mediadores químicos solúveis e, portanto, merece ser investigada (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020). A

permissividade de HBMECs ao ZIKV foi confirmada pelo aumento do número de cópias de RNA viral detectados no sobrenadante das mesmas. A literatura já tem demonstrado que o ZIKV é capaz de infectar células endoteliais constituintes da barreira placentária, barreira sangue e testículos, da veia umbilical e da própria BHE (ALIMONTI et al., 2018; KHAIBOULLINA et al., 2019; KUMAR et al., 2018a; PAPA et al., 2017). Segundo Papa et al., (2017), o ZIKV infecta HBMECs e cruza a BHE por passagem transcelular, processo ao qual o citoesqueleto de actina é indispensável.

Nós identificamos que a infecção de HBMECs por ZIKV está relacionada à integridade do citoesqueleto de actina, visto que o tratamento com citocalasina D, reduziu a carga viral tanto nos sobrenadantes de cultura, quanto nos extratos celulares. O citoesqueleto de actina é essencial para que os vírus consigam entrar e se replicar nas células-alvo, e o seu remodelamento no endotélio de grandes vasos mediante a infecção por ZIKV e DENV já foi mostrado por nós e outros (MLADINICH; SCHWEDES; MACKOW, 2017; PAPA et al., 2017; ZHANG et al., 2016; LIMA, 2018, p. 67). Associado a isso, alterações na estrutura do citoesqueleto de actina favorecem a perda de força e contratilidade das HBMECs, abertura dos espaços intercelulares e consequente aumento da permeabilidade de barreira endotelial (AL-OBAIDI et al., 2018; TAYLOR; KOYUNCU; ENQUIST, 2011).

Conforme acontece para as células neuronais, a infecção de HBMECs por ZIKV resultou em um perfil imune pró-inflamatório, com aumento significativo para TNF. Em contraste aos resultados de Papa et al., (2017), nós não identificamos aumentos significativos na quantificação de IL-6, nem níveis reduzidos de CXCL-8/IL-8. Nas infecções por JEV e VNO, IL-1 β , IL-6, TNF e CXCL-8/IL-8 estão associadas com expressão aumentada de MMP-2 e MMP-9, degradação das proteínas de junções intercelulares e perda de estabilidade da BHE, contribuindo para a imunopatologia da infecção (AL-OBAIDI et al., 2018; MUSTAFÁ et al., 2019; ROE et al., 2012; KHAIBOULLINA et al., 2019; SPINDLER; HSU, 2012).

Conforme nossos achados, o ZIKV reduziu a expressão de MMP-9 em HBMECs, com valores de $p < 0,05$. Esta proteína está particularmente relacionada com angiogênese e restabelecimento do fluxo sanguíneo em quadros de injúria cerebral (TURNER; SHARP, 2016). Quando aumentada, é uma das principais mediadoras da quebra de BHE, junto com MMP-2. Aumento da permeabilidade endotelial em HUVECs infectadas por ZIKV já foi demonstrada na literatura (KHAIBOULLINA et al., 2019). De acordo com Khaiboullina et al., (2019), este

processo é mediado pela regulação positiva de MMP-8, MMP-10 e MMP-13 e de VE-caderina (KHAIBOULLINA et al., 2019). Por outro lado, modificações na integridade e permeabilidade de BHE frente à infecção por ZIKV não foram observadas em estudo conduzido por Alimonti et al., 2018. Khaiboullina et al., (2019), sugere que a inconsistência dos dados pode estar relacionada as particularidades fisiológicas que células endoteliais constituintes de grandes e pequenos vasos carregam (KHAIBOULLINA et al., 2019; WANG; KHALIL, 2018).

A expressão de ICAM-1 e VCAM-1, essenciais à migração de células imunes periféricas pela BHE, não foi modificada pela infecção. Nas infecções por VNO, o aumento da expressão de moléculas de adesão celulares e transmigração de células imunes infectadas e não-infectadas é um dos principais mecanismos de acesso do vírus ao SNC e da amplificação da resposta neuroinflamatória (AL-OBAIDI et al., 2018; ROE; ORILLO; VERMA, 2014; KLEIN et al., 2019). Juntos, estes eventos contribuem para os extensivos danos que ocorrem à nível de BHE e desenvolvimento dos quadros neurológicos (AL-OBAIDI et al., 2018; ROE; ORILLO; VERMA, 2014; KLEIN et al., 2019).

Diante do exposto, sugerimos que as alterações de BHE mediadas por ZIKV, podem ser um efeito secundário da resposta pró-inflamatória gerada pela infecção de neurônios, micróglia, astrócitos e pericitos. Contextualizando essa hipótese, as células da barreira placentária atuam como um reservatório viral que favorece o acesso do ZIKV à circulação fetal. Uma vez que a BHE somente começa a ser formada a partir da oitava semana de gestação, o cérebro fetal estaria mais exposto ao vírus, caso a infecção ocorresse neste período, o que justifica por exemplo, o alto percentual de abortos espontâneos e casos de artrogripose quando a infecção materna ocorre ainda no primeiro trimestre da gravidez (SONAR; LAL, 2018; SWEENEY et al., 2019; MUSSO; KO; BAUD, 2019).

À medida que a gestação evolui, as HBMECs dão início a formação da BHE (KADRY; NOORANI; CUCULLO, 2020; SWEENEY et al., 2019). A expressão de AXL, um dos principais receptores de entrada para o ZIKV nestas células, no entanto, favorece a infecção e ativação da barreira (ALIMONTI et al., 2018). Esse processo contribui para a disseminação do vírus no SNC e regula a resposta inflamatória local pela liberação de citocinas (ALIMONTI et al., 2018; MLADINICH; SCHWEDES; MACKOW, 2017; PAPA et al., 2017).

Citocinas, quimiocinas e MMPs produzidas pelas células neuronais infectadas, poderiam desencadear uma série de eventos que alteram o funcionamento da BHE, tais como: 1) amplificação da produção de mediadores inflamatórios pelas HBMECs; 2) recrutamento de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão celulares – Análises histológicas de tecido cerebral, já demonstraram infiltrado destas células frente a infecção por ZIKV – (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016); e, 3) destruição e/ ou interação diminuída das proteínas de junções intercelulares e do citoesqueleto de actina, responsáveis pela manutenção da integridade de barreira endotelial (AL-OBAIDI et al., 2018; LI et al., 2015). Juntos, esses processos ampliam a disseminação do ZIKV e a liberação de moléculas neurotóxicas dentro do SNC, contribuindo para o desenvolvimento das alterações congênitas.

Juntos, estes dados sugerem fortemente a neuroinflamação como um processo determinante para o desenvolvimento da SCZ. As moléculas e vias aqui identificadas podem ser alvo de estudos futuros para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas que diminuam a morbimortalidade associada à infecção de fetos e RNs por ZIKV.

8. CONCLUSÕES

- O ZIKV induz um perfil pró-inflamatório persistente em LCR de crianças com microcefalia associada à infecção, caracterizado pela detecção de IFN- α , CXCL-9 e CXCL-10/ IP-10, principalmente;
- As células SH-SY5Y e HBMECs são suscetíveis e permissivas à infecção por ZIKV *in vitro*;
- A infecção *in vitro* de células SH-SY5Y reproduz uma assinatura imune pró-inflamatória, com diferenças estatisticamente significativas para IL-1 β , IL-6 e TNF;
- O ZIKV diminui a expressão de *MMP-2* e aumenta a expressão de *MMP-1*, *MMP-3* e *MMP-9* em células SH-SY5Y *in vitro*;
- Os transcritos de *TLR3*, *IFNA1* e *IFNB1* são regulados positivamente em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV *in vitro*;
- O IFN- α é uma citocina inflamatória chave para o *clearence* viral e modulação da resposta imune desencadeada em células SH-SY5Y infectadas por ZIKV, uma vez que a inibição desta molécula, regulou negativamente a produção de quimiocinas, como CXCL-10/ IP-10, CXCL-8/ IL-8 e CCL2/ MCP-1, além de promover o aumento da carga viral e do número de células apoptóticas;
- A produção de mediadores inflamatórios por células SH-SY5Y infectadas com ZIKV é parcialmente dependente da ativação de MAPK p38;
- A infecção de HBMECs por ZIKV está relacionada à integridade do citoesqueleto de actina e induz aumento da produção de TNF e IL-12p70;
- Os níveis de expressão de *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9* é discretamente influenciada pelo vírus em HBMECs;
- A expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em HBMECs não foi modificada pela infecção por ZIKV.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K. M. *et al.* Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5269613/>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- ADEBANJO, T. *et al.* Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, United States, v. 66, n. 41, p. 1089–1099, 2017.
- AGUIRRE, S. *et al.* DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1-14, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464218/>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- AID, M. *et al.* Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**, Cambridge, v. 169, n. 4, p. 610- 620, 2017.
- ALIMONTI, J. B. *et al.* Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. **Fluids and Barriers of the CNS**, London, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952854/>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- ALMEIDA, P. R. *et al.* Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. **bioRxiv Microbiology**, p. 1-14, 1947. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/828871v1>. Acesso em: 20 mar. 2020.
- ASIF, A. *et al.* Zika Virus: Immune evasion mechanisms, currently available therapeutic regimens, and vaccines. **Viral Immunology**, New York, v. 30, n. 10, p. 682–690, 2017.
- AZAMOR, T. *et al.* Congenital Zika Syndrome Is Associated With Interferon Alfa Receptor 1. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8657619/>. Acesso em: 20 fev. 2022.
- AZEVEDO, R. S. S. *et al.* In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5758755/>. Acesso em: 15 feb. 2020.
- BARBEITO-ANDRÉS, J. *et al.* Congenital Zika syndrome is associated with maternal protein malnutrition. **Science Advances**, Washington, v. 6, n. 2, p. eaaw6284, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31950075/>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- BARBI, L. *et al.* Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 22, n. 2, p. 137-141, 2018.
- BARJAS-CASTRO, M. L. *et al.* Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, 2016.
- BARROWS, N. J. *et al.* Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses.

Chemical Reviews, Easton, v. 118, n. 8, p. 4448–4482, 2018.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118, n. 2, p. 413-420, 2008.

BERNATCHEZ, J. A. *et al.* Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 63, n. 2, p. 470-489, 2020.

BETAKOVA, T. *et al.* Cytokines Induced During Influenza Virus Infection. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 23, n. 18, p. 2616-2622, 2017.

BIAN, P. *et al.* RIPK3 Promotes JEV Replication in Neurons via Downregulation of IFI44L. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, p. 1-15, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105639/>. Acesso em: 10 jun. 2021.

BLÁZQUEZ, A. B.; SAIZ, J. C. Neurological manifestations of Zika virus infection. **World Journal of Virology**, Hong Kong, v. 5, n. 4, p. 135-143, 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika) até SE 22. v. 51, n. 23, 2020a. Disponível em: <<https://www.conasems.org.br/wp-content/uploads/2020/06/Boletim-epidemiologico-SVS-23.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes. v. 51, n. 24, 2020b. Acesso em: 18 abr. 2021.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (BRASIL). Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em 2020, até a SE 45. v. 51, n. 47, 2020c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_47.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2021.

BOWEN, J. R. *et al.* Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. 1-30, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5289613/>. Acesso em: 15 mar. 2021.

BRITO, C. Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 28, n. 6, p. 679-680, 2016.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. *et al.* Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, London, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797251/>. Acesso em: 07 jul. 2021.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CAMACHO-ZAVALA, E. *et al.* Pregnant women infected with zika virus show higher viral load and immunoregulatory cytokines profile with cxcl10 increase. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7827657/>. Acesso em: 10 jun. 2021.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, 2014.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, London, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CAROD-ARTAL, F. J. Neurological complications of Zika virus infection. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 16, n. 5, p. 399-410, 2018.

CARSON, M. J. *et al.* CNS immune privilege: Hiding in plain sight. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 213, n. 1, p. 48–65, 2006.

CASTANHA, P. M. S. *et al.* Reciprocal immune enhancement of dengue and Zika virus infection in human skin. **JCI Insight**, Michigan, v. 5, n. 3, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://insight.jci.org/articles/view/133653>. Acesso em: 15 maio 2021.

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

CHEN, J. C. *et al.* Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 51, p. 139–140, 1 out. 2016.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, Albany, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2018.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Update on non-vector transmission of dengue: Relevant studies with Zika and other flaviviruses. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, London, v. 2, n. 15, p. 1-6, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28883959/>. Acesso em: 10 jul. 2020

CHENG, F. *et al.* Suppression of Zika Virus Infection and Replication in Endothelial Cells and Astrocytes by PKA Inhibitor PKI 14-22. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 92, n. 4, p. 1-17, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790943/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

CHONG, H. Y. *et al.* Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**, Amsterdam, v. 274, p. 1-61, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31626874/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

CHOPRA, S.; OVERALL, C. M.; DUFOUR, A. Matrix metalloproteinases in the CNS: interferons get nervous. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 76, n. 16, p. 3083–3095, 2019.

CHOWDHURY, A. *et al.* JNK pathway restricts DENV, ZIKV and CHIKV infection by activating complement and apoptosis in mosquito salivary glands. **Plos Pathogens**, v. 16, n. 8, p. 1-24, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7444518/>. Acesso em: 14 jun. 2021.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. **The Lancet**, London, v. 387, n. 10030, p. 1811-1812, 2016.

- CORRALES, T. L. R.; LOSADA-PÉREZ, M.; CASAS-TINTÓ, S. JNK Pathway in CNS Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 8, p. 1-12, 2021.
- CROW, Y. J.; MANEL, N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 15, n. 7, p. 429–440, 2015.
- CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, London, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.
- DA SILVA, S. J. R.; PARDEE, K.; PENA, L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A review. **Viruses**, Basel, v. 12, n. 1, p. 1-20, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7019470/>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- DAFFIS, S. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. **Nature**, London, v. 468, n. 7322, p. 452–456, 2010.
- DAI, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.
- DANG, J. *et al.* Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016.
- DE ARAÚJO, T. V. B. *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 18, n. 3, p. 328-336, 2018.
- DE CARVALHO, O. V. *et al.* The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptapurine riboside (6MMP_r) effectively blocks Zika virus replication. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 50, n. 6, p. 718–725, 2017.
- DE MENDONÇA-VIEIRA, L. R. *et al.* Reactive oxygen species (Ros) are not a key determinant for zika virus-induced apoptosis in sh-sy5y neuroblastoma cells. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 11, p. 1-17, 2021.
- DE OLIVEIRA, K. W. *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. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, United States, v. 65, n. 9, p. 242-247, 2016.
- DEMIR, T.; KILIC, S. Zika virus: a new arboviral public health problem. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 61, n. 6, p. 523-527, 2016.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DING, Q. *et al.* Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 115, n. 27, p. E6310–

E6318, 2018.

DIOP, F. *et al.* Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 10, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6201926/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 139, p. 136–153, 2016.

DONALD, C. L. *et al.* Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-20, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27706161/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DOS SANTOS, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain-Barré syndrome - Case series from seven countries. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 375 n. 16 p. 1598-1601, 2016.

DOWALL, S. D. *et al.* Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. 1-22, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5510909/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

ELSHAZZLY, M. *et al.* Embryology, Central Nervous System. **Stat Pearls**, Treasure Island, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526024/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

ESPINAL, M. A. *et al.* Emerging and reemerging aedes-transmitted arbovirus infections in the region of the americas: Implications for health policy. **American Journal of Public Health**, New York, v. 109, n. 3, p. 387-392, 2019.

ESSER-NOBIS, K. *et al.* Comparative Analysis of African and Asian Lineage-Derived Zika Virus Strains Reveals Differences in Activation of and Sensitivity to Antiviral Innate Immunity. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 93, n. 13, p. 1-18, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6580957/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

ESTÉVEZ-HERRERA, J. *et al.* Zika Virus Pathogenesis: A Battle for Immune Evasion. **Vaccines**, Basel, v. 9, n. 3, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8005041/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

FALLAHI, P.; ELIA, G. Interferon- γ -induced protein 10 in Dengue Virus infection. **La Clinica terapeutica**, Roma, v. 167, n. 6, p. 186–191, 2016.

FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, New York, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FARIA, N. R. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, London, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 2017.

FERNANDES, N. D.; ARYA, K.; WARD, R. Congenital Herpes Simplex. **Stat Pearls**,

Treasure Island, 2021. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507897/>. Acesso em: 14 fev. 2022.

FERRARIS, P. et al. Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 8, n. 1, p. 1003–1016, 1 jan. 2019.

FORRESTER, J. V.; MCMENAMIN, P. G.; DANDO, S. J. CNS infection and immune privilege. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 19, n. 11, p. 655–671, 2018.

FREITAS, D. A. et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 12, p. 1-27, 2020. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7737899/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

GABRIEL, E. *et al.* Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 397- 406, 2017.

GACK, M. U.; DIAMOND, M. S. Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 20, p. 119-128, 2016.

GARCIA, M. *et al.* Skin innate immune response to flaviviral infection. **European Cytokine Network**, Montrouge, v. 28, n. 2, p. 41–51, 2017.

GEORGE, S.; VISWANATHAN, R.; SAPKAL, G. N. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. **Biological research**, Santiago, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6712747/>. Acesso em: 15 jul. 2021.

GILHUS, N. E.; DEUSCHL, G. Neuroinflammation — a common thread in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, London, v. 15, n. 8, p. 429–430, 2019.

GIRON, S. *et al.* Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. **Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, Saint-Maurice, v. 24, n. 45, p. 1-4, 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6852313/>. Acesso em: 14 mar. 2021.

GOBILLOT, T. A. *et al.* The robust restriction of Zika virus by type-I interferon in A549 cells varies by viral lineage and is not determined by IFITM3. **Viruses**, Basel, v. 12, n. 5, p. 1-18, 2020. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290589/>. Acesso em: 25 maio 2021.

GOH, K. C.; HAQUE, S. J.; WILLIAMS, B. R. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 18, n. 20, p. 5601-5608, 1999.

GONCALVES, A. *et al.* Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 217, n. 7, p. 1060–1068, 2018.

GOUTIÈRES, F. Aicardi-Goutières syndrome. **Brain & development**, Tokyo, v. 27, n. 3, p. 201–206, 2005.

- GRANT, A. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.
- GUEDES, D. R. D. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 6, n. 8, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583667/>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 5, n. 9, p. 1-5, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5113053/>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology and Evolution**, London, v. 3, n. 4, p. 561-569, 2019.
- HAMEL, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, Baltimore, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.
- HAMMACK, C. *et al.* Zika Virus Infection Induces DNA Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 93, n. 20, p. 638–657, 2019.
- HANNOODEE, S.; NASURUDDIN, D. N. Acute Inflammatory Response. **Stat Pearls**, Treasure Island, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- HARJUNPÄÄ, H. *et al.* Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, n. 1078, p. 1-24, 2019.
- HASAN, S. S. *et al.* Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural and Molecular Biology**, New York, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2018.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.
- HERVAS-STUBBS, S. *et al.* Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 17, n. 9, p. 2619–2627, 2011.
- HSIEH, J. T.; JOHN, A. L. S. T. Japanese encephalitis virus and its mechanisms of neuroinvasion. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 16, n. 4, p. 1-6, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7117652/>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- HU, T. *et al.* The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. **Virologica Sinica Science Press**, Beijing, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2019.
- HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 34, p. 104–109, 2019.
- AL-OBAIDI, M. M.J. *et al.* REVIEW Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system. **Acta virologica**, Prague, v. 62, p. 16–27, 2018.

JIANG, X. *et al.* Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response. **Immunity**, Cambridge, v. 36, n. 6, p. 959–973, 2012.

JONES, R. *et al.* Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 2, p. 1-17, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7004335/>. Acesso em: 21 abr. 2021.

JOVANOVIĆ, M. *et al.* Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 4, p. 789–798, 2010.

JUPILLE, H. *et al.* Zika Virus, a New Threat for Europe? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. 1-8, 2016.

KADRY, H.; NOORANI, B.; CUCULLO, L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. **Fluids and Barriers of the CNS**, London, v. 17, n. 1, p. 1-24, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7672931/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

KASPRZYKOWSKI, J. I. *et al.* A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 96, p. 579–581, 2020.

KAZMI, S. S. *et al.* A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 27, n. 5, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7057477/>. Acesso em: 27 set. 2020

KHAIBOULLINA, S. *et al.* Transcriptome profiling reveals pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase activation in Zika virus infected human umbilical vein endothelial cells. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 10, n. 642, p. 1-17, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6582368/>. Acesso em: 20 maio 2021.

KHUU, M. A. *et al.* Stage-dependent effects of intermittent hypoxia influence the outcome of hippocampal adult neurogenesis. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7966401/>. Acesso em: 25 jan. 2022.

KIM, J. A. *et al.* Insights into ZIKV-Mediated Innate Immune Responses in Human Dermal Fibroblasts and Epidermal Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 139, n. 2, p. 391–399, 2019.

KLEIN, R. S. *et al.* Neuroinflammation During RNA Viral Infections. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 37, p. 73-95, 2019.

KOO, B. C. A. *et al.* Relationships between Hepatitis C Virus Replication and CXCL-8 Production In Vitro. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, n. 16, p. 7885-7893, 2006.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. **Methods in molecular biology**, Clifton, v.

1078, p. 9-21, 2013.

KUMAR, A. *et al.* Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5883016/>. Acesso em: 15 jan. 2022

KUMAR, R. *et al.* Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication. **Virus Research**, Amsterdam, v. 253, p. 48-61, 2018b.

LAUFER HALPIN, A. *et al.* Post-Campylobacter Guillain Barré Syndrome in the USA: Secondary analysis of surveillance data collected during the 2009-2010 novel Influenza A (H1N1) vaccination campaign. **Epidemiology and Infection**, Cambridge University Press, v. 146, n. 13, p. 1740-1745, 2018.

LEAL, M. C. *et al.* Hearing Loss in Infants with Microcephaly and Evidence of Congenital Zika Virus Infection — Brazil, November 2015–May 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 34, p. 917–919, 2016.

LEDA, A. R. *et al.* Selective Disruption of the Blood–Brain Barrier by Zika Virus. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 2158, p. 1-14, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6759472/>. Acesso em: 14 maio 2021.

LEE, J. Y.; NGUYEN, T. T. N.; MYOUNG, J. Zika Virus-Encoded NS2A and NS4A Strongly Downregulate NF- κ B Promoter Activity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 30, n. 11, p. 1651–1658, 2020.

LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 56, n. 8, p. 1386-1402, 2015.

LETA, S. *et al.* Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 67, p. 25–35, 2018.

LI, F. *et al.* Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 89, n. 10, p. 5602–5614, 2015.

LI, W. *et al.* Zika virus circumvents host innate immunity by targeting the adaptor proteins MAVS and MITA. **FASEB Journal**, Hoboken, v. 33, n. 9, p. 9929–9944, 2019.

LI, X. D. *et al.* Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 49, p. 17717–17722, 2005.

LIMA, M. C. *et al.* The transcriptional and protein profile from human infected neuroprogenitor cells is strongly correlated to zika virus microcephaly cytokines phenotype evidencing a persistent inflammation in the CNS. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, n. 1928, p. 1-14, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707094/>. Acesso em: 25 maio 2021.

LIMA, M. C. *et al.* The P-MAPA immunomodulator partially prevents apoptosis induced by Zika virus infection in THP-1 cells. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 22, n. 4, p. 514-522, 2020.

- LIMA, M. C. **Caracterização de novos modelos celulares (in vitro) para testes de drogas com potencial antiviral contra o vírus zika**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28047>. Acesso em: 5 fev. 2021.
- LIU-HELMERSSON, J. *et al.* Vectorial Capacity of *Aedes aegypti*: Effects of Temperature and Implications for Global Dengue Epidemic Potential. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-10, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946027/>. Acesso em: 25 abr. 2021.
- LIU, S. *et al.* AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. **Circulation Research**, Baltimore, v. 119, n. 11, p. 1183–1189, 2016.
- LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5661633/>. Acesso em: 14 abr. 2021.
- LONDONO-RENTERIA, B. *et al.* A relevant in vitro human model for the study of Zika virus antibody-dependent enhancement. **The Journal of General Virology**, London, v. 98, n. 7, p. 1702–1712, 2017.
- LOWE, R. *et al.* The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 15, n. 96, p. 1-18, 2018.
- LUDLOW, M. *et al.* Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 131, n. 2, p. 159-184, 2016.
- LUNDBERG, R. *et al.* Zika Virus Non-Structural Protein NS5 Inhibits the RIG-I Pathway and Interferon Lambda 1 Promoter Activation by Targeting IKK Epsilon. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 1024, p. 1-20, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893776/>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- MAGALHAES, T. *et al.* Mosquito-borne and sexual transmission of Zika virus: Recent developments and future directions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 254, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28705681/>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- MAN, S.; UBOGU, E. E.; RANSOHOFF, R. M. Inflammatory Cell Migration into the Central Nervous System: A Few New Twists on an Old Tale. **Brain Pathology**, Zurich, v. 17, n. 2, p. 243-250, 2007.
- MANANGEESWARAN, M.; IRELAND, D. D. C.; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1-20, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5113993/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MARINHO, F. *et al.* Microcephaly in Brazil: prevalence and characterization of cases from the Information System on Live Births (Sinasc), 2000-2015. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000400004>. Acesso em: 15 maio 2021.

MARQUES, V. DE M. *et al.* Neurological Complications of Congenital Zika Virus Infection. **Pediatric Neurology**, Chippewa Falls, v. 91, p. 3–10, 2019.

MARTINES, R. B. *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. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 6, p. 159–160, 2016.

MARTINET, J. P. *et al.* Mosquitoes of north-western Europe as potential vectors of arboviruses: A review. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 11, p. 1-18, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893686/>. Acesso em: 9 jul. 2020

MAUCOURANT, C. *et al.* Zika virus in the eye of the cytokine storm. **European Cytokine Network**, Montrouge, v. 30, n. 3, p. 74–81, 2019.

MEAD, P. S.; HILLS, S. L.; BROOKS, J. T. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 31, n.1, p. 39-44, 2018.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, London, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MELLO, C. *et al.* Natural infection and vertical transmission of two flaviviruses (Yellow fever and Zika) in mosquitoes in primary forests in the Brazilian state of Rio de Janeiro (Diptera: Culicidae). **bioRxiv Molecular Biology**, p. 1–25, 2019. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/688713v1>. Acesso em: 25 abr. 2021.

METSKY, H. C. *et al.* Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**, London, v. 546, n. 7658, p. 411–415, 2017.

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

MLADINICH, M. C.; SCHWEDES, J.; MACKOW, E. R. Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **mBio**, Washington, v. 8, n. 4, p. 1-17, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513708/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

MUNÓZ, LAURA S.; PARRA, BEATRIZ; PRADO, C. A. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 216, n. 10, p. 897–905, 2017.

MUSSO, D. *et al.* Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 2019.

MUSTAFÁ, Y. M. *et al.* Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. 525, p. 1-14, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6447710/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

MUTHURAJ, P. G. *et al.* Zika virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in placental trophoblasts. **Cell Death Discovery**, New York, v. 7, n. 1,

p. 1-17, 2021. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7838309/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

NASCIMENTO-CARVALHO, G. C. *et al.* Zika-exposed microcephalic neonates exhibit higher degree of inflammatory imbalance in cerebrospinal fluid. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 8474, p. 1-10, 2021. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8055905/>. Acesso em: 15 jan. 2021.

NAVECA, F. G. *et al.* Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 6, p. 1–13, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5961926/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

NELEMANS, T.; KIKKERT, M. Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 961, p. 1-23, 2019.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832425/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

NGAN, N. T. T. *et al.* Zika virus proteins NS2A and NS4A are major antagonists that reduce IFN- β promoter activity induced by the MDA5/RIG-I signaling pathway.

Journal of Microbiology and Biotechnology, Seoul, v. 29, n. 10, p. 1665–1674, 2019.

NIRANJAN, R.; MUTHUKUMARAVEL, S.; JAMBULINGAM, P. The Involvement of Neuroinflammation in Dengue Viral Disease: Importance of Innate and Adaptive Immunity. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v. 26, p. 111–118, 2019.

NOGUEIRA, M. L. *et al.* Zika Virus Infection and Solid Organ Transplantation: A New Challenge. **American Journal of Transplantation**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 791–795, 2017.

NOORBAKHS, F. *et al.* Zika virus infection, basic and clinical aspects: A review article. **Iranian Journal of Public Health**, Tihân, v. 48, n. 1, p. 20–31, 2019.

O'CALLAGHAN, J. P.; MILLER, D. B. Neuroinflammation disorders exacerbated by environmental stressors. **Metabolism: Clinical and Experimental**, New York, v. 100, n. 153951, p. 1-9, 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6800732/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by guillain-barré syndrome - -case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 19, n. 9, 2014. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>. Acesso em: 14 abr. 2021.

OJHA, C. R. *et al.* Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, n. 2340, p. 1-12, 2018.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6196287/>. Acesso em: 30 set. 2020

OPAS/OMS. Cases of Zika Virus Disease, 2020. Disponível em:

https://www.paho.org/data/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=524:zika-weekly-en&Itemid=352. Acesso em: 15 set. 2020

OMS. Global overview ZIKA EPIDEMIOLOGY UPDATE, 2019. Disponível em:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf>. Acesso em: 15 set. 2020.

ORNELAS, A. M. M. *et al.* Immune activation in amniotic fluid from Zika virus–associated microcephaly. **Annals of Neurology**, Boston, v. 81, n. 1, p. 152–156, 2017.

ÖSTERLUND, P. *et al.* Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 15710, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6823455/>. Acesso em: 14 ago. 2021.

OVERALL, R. W.; KEMPERMANN, G. The Small World of Adult Hippocampal Neurogenesis. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, v. 12, n. 641, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158315/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

PAPA, M. P. *et al.* Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 2557, p. 1-17, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5743735/>. Acesso em: 15 set. 2021.

PERSIDSKY, Y. *et al.* Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, New York, v. 1, n. 3, p. 223–236, 2006.

PIELNAA, P. *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology Academic**, New York, v. 543, p. 34-42, 2020.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007.

QUANQUIN, N.; WANG, L.; CHENG, G. Potential for treatment and a Zika virus vaccine. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 114-121, 2017.

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

RAJAH, M. M. *et al.* Zika Virus: Emergence, Phylogenetics, Challenges, and Opportunities. **ACS Infectious Diseases**, Washington, v. 2, n. 11, p. 763–772, 2016.

RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 122, n. 2, p. 1164-1171, 2012.

ROE, K. *et al.* West nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. **Journal of General Virology**, London, v. 93, n. 6, p. 1193–1203, 2012.

RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Raf/MEK/ERK pathway activation is required for Junín virus replication. **The Journal of general virology**, London, v. 95, n. 4, p. 799–805, 2014.

ROE, K.; ORILLO, B.; VERMA, S. West nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and

modulate permeability of the in vitro blood-brain barrier model. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. 1-12, 2014.

ROMBI, F. *et al.* The journey of Zika to the developing brain. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 3097–3115, 2020.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**, New York, v. 39, n. 3, p. 279–291, 2002.

ROSSI, Á. D. *et al.* Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 285, n. 2, p. 215–222, 2019.

SAGER, G. *et al.* Role of host cell secretory machinery in zika virus life cycle. **Viruses**, Basel, v. 10, n. 559, p. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6213159/>. Acesso em: 20 jul. 2020

SAKKAS, H.; ECONOMOU, V.; PAPADOPOULOU, C. Zika virus infection: Past and present of another emerging vector-borne disease. **Journal of Vector Borne Diseases**, New Delhi, v. 53, n. 4, p. 305–311, 2016.

SAMPIERI, C. L.; MONTERO, H. Breastfeeding in the time of Zika: a systematic literature review. **PeerJ**, Corte Madera, v. 7, p. 1-20, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6385688/>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SÁNCHEZ-SAN, C. M. *et al.* Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 14543, p. 1-10, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6162312/>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SANTIAGO, G. A. *et al.* Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, London, v. 9, n. 1391, p. 1-10, 2018.

SCHIELA, B. *et al.* Active human complement reduces the zika virus load via formation of the membrane-attack complex. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, n. 2177, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6199351/>. Acesso em: 5 fev. 2021.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 32, p. 513-545, 2014.

SCREATON, G.; CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J. The immunology of Zika Virus. **F1000 Research**, v. 7, n. 203, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820595/>. Acesso em: 29 jul. 2020

SCREATON, G.; MONGKOLSAPAYA, J. Evolution of neurovirulent Zika virus. **Science**, New York, v. 358, n. 6365, p. 863-864, 2017.

SERMAN, T. M.; GACK, M. U. Evasion of innate and intrinsic antiviral pathways by the Zika Virus. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 970, p. 1-19, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6833475/>. Acesso em: 23 jul. 2020

SHABAB, T. *et al.* Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, New York, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017.

SHARIFIAN-DORCHE, M. *et al.* Neurological complications of coronavirus infection:

- a comparative review and lessons learned during the COVID-19 pandemic. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 417, n. 117085, p. 1-19, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7413162/>. Acesso em: 15 ago. 2021.
- SHARP, T. M. *et al.* Dengue and zika virus diagnostic testing for patients with a clinically compatible illness and risk for infection with both viruses. **MMWR Recommendations and Reports**, Atlanta, v. 68, n. 1, p. 1–10, 2019.
- SHIVES, K. D.; TYLER, K. L.; BECKHAM, J. D. Molecular mechanisms of neuroinflammation and injury during acute viral encephalitis. **Journal of neuroimmunology**, Amsterdam, v. 308, p. 102–111, 2017.
- SIDAHMED, A. M. E. *et al.* CXCL10 contributes to p38-mediated apoptosis in primary T lymphocytes in vitro. **Cytokine**, Philadelphia, v. 59, n. 2, p. 433–441, 2012.
- SINGH, R. K. *et al.* Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, Boston, v. 36, n. 3, p. 150–175, 2016.
- SMARTT, C. T. *et al.* *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Florida transmitted Zika virus. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 768, p. 1-4, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932354/>. Acesso em: 14 ago. 2021.
- SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 69, n. 2, p. 223–34, 1952.
- SOARES-SILVA, M. *et al.* The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 183, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764696/>. Acesso em: 15 ago. 2021.
- SONAR, S. A.; LAL, G. Blood–brain barrier and its function during inflammation and autoimmunity. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 103, n. 5, p. 839–853, 2018.
- SOUZA, B. S. F. *et al.* Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 39775, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5180086/>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- SPARRER, K. M. J.; GACK, M. U. Intracellular detection of viral nucleic acids. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 26, p. 1-9, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084527/>. Acesso em: 31 jul. 2020
- SPINDLER, K. R.; HSU, T. H. Viral disruption of the blood-brain barrier. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, n. 6, p. 282-290, 2012. [20\(6\): 282–290.](#)
- SUI, Y. *et al.* CXCL10-induced cell death in neurons: Role of calcium dysregulation. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 957–964, 2006.
- SUN, S. C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. **Cell Research**, Beijing, v. 21, n. 1, p. 71–85, 2011.

- SWEENEY, M. D. *et al.* Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. **Physiological Reviews**, Washington, v. 99, n. 1, p. 21-78, 2019.
- TANG, H. *et al.* Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.
- TAPPE, D. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.
- TAYLOR, M. P.; KOYUNCU, O. O.; ENQUIST, L. W. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. **Nature reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 6, p. 427-439, 2011.
- TEIXEIRA, F. M. E. *et al.* Maternal-Fetal Interplay in Zika Virus Infection and Adverse Perinatal Outcomes. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, n. 175, p. 1-15, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7033814/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- TONG, C. K.; VIDYADARAN, S. Role of microglia in embryonic neurogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 241, n. 15, p. 1669–1675, 2016.
- TRIPATHI, S. *et al.* A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 3, p. 1-19, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5373643/>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- TSAI, Y. T. *et al.* Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 604–615, 2009.
- TURNER, R. J.; SHARP, F. R. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, v. 10, n. 56, p. 1-13, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777722/>. Acesso em: 5 mar. 2022.
- UBOL, S. *et al.* Mechanisms of Immune Evasion Induced by a Complex of Dengue Virus and Preexisting Enhancing Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 201, n. 6, p. 923–935, 2010.
- UCHIDA, L. *et al.* The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 7395, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4261170/>. Acesso em: 15 jul. 2021.
- URBÁN, N.; GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, v. 8, n. 396, p. 1-19, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245909/>. Acesso em: 15 jun. 2021.
- VAN DEN POL, A. N. *et al.* Zika virus targeting in the developing brain. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 37, n. 8, p. 2161–2175, 2017.
- VICTORIA, E. C. G. *et al.* Up-regulation of brain cytokines and metalloproteinases 1 and 2 contributes to neurological deficit and brain damage in transient ischemic stroke. **Microvascular Research**, New York, v. 129, n. 103973, p. 1-5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.103973>. Acesso em: 14 fev. 2022.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 860-867, 2016.

WANG, A. *et al.* Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 3, p. 1-6, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378920/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

WANG, L. *et al.* p38 activation and viral infection. **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v. 24, p. e4, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/erm.2021.29>. Acesso em: 5 mar. 2022.

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling and Vascular Disease. **Advances in Pharmacology**, San Diego, v. 81, p. 241-330, 2018.

WEN, Z.; SONG, H.; MING, G. L. How does Zika virus cause microcephaly? **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 31, n. 9, p. 849-861, 2017.

WESTON, C. R.; DAVIS, R. J. The JNK signal transduction pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 142-149, 2007.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, London, v. 388, n. 10045, p. 717-727, 2016.

WU, Y. *et al.* Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, London, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359216/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

YANG, Y.; HILL, J. W.; ROSENBERG, G. A. Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 99, p. 241-263, 2011.

YOCKEY, L. J. *et al.* Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. **Science Immunology**, Washington, v. 3, n. 19, p. 1-24, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6049088/>. Acesso em: 14 fev. 2022.

YUAN, L. *et al.* A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, New York, v. 358, n. 6365, p. 933-936, 2017.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

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

ZHANG, W.; LI, H. T.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 9-18, 2002.

ZHENG, C. *et al.* Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, Lausanne, v. 12, n. 314, p. 1-12, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6965019/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

ZHENG, Y. *et al.* Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by

cleaving cGAS via NS 1-caspase-1 axis. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 18, p. 1-18, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6138430/>. Acesso em: 14 ago. 2021.

ZHOU, Y. *et al.* Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) Expression in Rat Spinal Cord Injury Model. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 34, n. 8, p. 1151–1163, 2014.

ZHU, S. *et al.* p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 145, p. 70–81, 2017.

ANEXO B – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS RNs INCLUÍDOS NO ESTUDO

INFORMAÇÕES CLÍNICAS (RNs ao nascer)								
ID amostra	Data de nascimento	Idade (dia da coleta da amostra)	Sexo	Circunferência da cabeça (cm)	Peso (gramas)	Comprimento (cm)	Nascimento	Definição da SCZ
CS1	27/11/2015	<1 mês	F	32,0	2410	47,0	A termo	Saudável
CS2	24/01/2016	<1 mês	F	32,0	2410	49,0	A termo	Saudável
CS3	23/11/2015	1 dia	F	32,0	2560	47,0	A termo	Saudável
CS4	23/11/2015	2 dias	M	32,0	2390	40,0	A termo	Saudável
CS5	19/11/2015	7 dias	M	33,0	3290	48,0	Pós termo	Saudável
CS6	24/11/2015	7 dias	M	33,0	3250	49,0	A termo	Saudável
CS7	20/11/2015	21 dias	F	32,0	2670	46,0	A termo	Saudável
CS8	22/11/2015	19 dias	M	33,0	3190	48,0	A termo	Saudável
CS9	18/11/2015	<1 mês	F	33,0	3650	53,0	A termo	Saudável
CS10	09/11/2015	<1 mês	F	31,0	2650	45,0	Pré termo	Saudável
CS11	27/11/2015	<1 mês	F	32,0	2125	44,0	A termo	Saudável
CS12	30/12/2015	6 dias	F	32,0	2535	44,0	A termo	Saudável
CS13	02/01/2016	4 dias	F	32,0	3030	48,0	A termo	Saudável
CS14	11/01/2016	4 dias	M	32,0	2440	46,0	A termo	Saudável
CS15	11/01/2016	4 dias	M	32,0	2440	46,0	A termo	Saudável
CS16	14/01/2016	4 dias	F	32,0	3580	49,5	A termo	Saudável
CS17	07/01/2016	13 dias	F	31,5	2335	43,0	Pré termo	Saudável
CS18	22/01/2016	3 dias	F	32,0	3260	45,0	A termo	Saudável
CS19	04/12/2015	<1 mês	F	32,0	3040	48,0	A termo	Saudável
CS20	05/12/2015	<1 mês	F	32,0	2690	49,0	A termo	Saudável
CS21	15/11/2015	<1 mês	F	32,0	2900	46,0	A termo	Saudável
CS22	27/11/2015	<1 mês	M	32,0	2590	46,0	A termo	Saudável
CS23	13/02/2016	9 dias	M	32,0	2670	49,0	A termo	Saudável
CS24	15/01/2016	<1 mês	F	32,0	2800	49,0	A termo	Saudável
CS25	05/03/2016	2 dias	M	31,0	2705	51,0	A termo	Saudável
CS26	25/02/2016	17 dias	M	30,0	2150	27,0	A termo	Saudável
CS27	10/02/2016	<1 mês	F	32,0	2700	45,0	A termo	Saudável
M1	16/10/2015	27 dias	M	31,0	3750	48,0	A termo	Microcefalia

M2	01/10/2015	<1 mês	M	25,0	1890	40,0	Pré termo	Microcefalia
M3	22/11/2015	2 dias	M	31,0	2785	46,0	A termo	Microcefalia
M4	21/10/2015	<1 mês	M	29,0	2830		Pré termo	Microcefalia
M5	15/10/2015	<1 mês	F	25,0	1980		Pré termo	Microcefalia
M6	05/12/2015	2 dias	M	31,0	3338	46,0	A termo	Microcefalia
M7	10/12/2015	4 dias	F	31,5	3000	47,5	A termo	Microcefalia
M8	13/11/2015	<1 mês	M	31,0	3020	46,0	A termo	Microcefalia
M9	30/12/2015	9 dias	M	29,0	2610	43,5	Pré termo	Microcefalia
M10	30/12/2015	28 dias	F	31,0	2830	45,0	A termo	Microcefalia
M11	06/01/2016	<1 mês	F	31,0	2770	50,0	A termo	Microcefalia
MG1	19/11/2015	<1 mês	F	28,0	2765	45,0	A termo	Microcefalia Grave
MG2	10/12/2015	<1 mês	F	29,0	2540	43,0	A termo	Microcefalia Grave
MG3	31/10/2015	17 dias	M	29,0	3100		A termo	Microcefalia Grave
MG4	08/11/2015	9 dias	M	27,0	2750	44,0	A termo	Microcefalia Grave
MG5	22/10/2015	26 dias	M	29,5			A termo	Microcefalia Grave
MG6	16/10/2015	<1 mês	M	28,0	2300	43,0	A termo	Microcefalia Grave
MG7	20/11/2015	4 dias	F	29,0	2870	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG8	21/11/2015	3 dias	F	26,0	2580	45,0	A termo	Microcefalia Grave
MG9	17/10/2015	<1 mês	F	30,0	2460	44,0	A termo	Microcefalia Grave
MG10	07/10/2015	<1 mês	F	29,0	2580	42,5	A termo	Microcefalia Grave
MG11	23/11/2015	2 dias	F	28,0	2920	48,0	A termo	Microcefalia Grave
MG12	25/11/2015	2 dias	F	27,0	2750	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG13	21/11/2015	9 dias	M	29,0	2540		Pós termo	Microcefalia Grave
MG14	28/11/2015	3 dias	M	26,5	2385	45,0	A termo	Microcefalia Grave
MG15	24/11/2015	9 dias	M	30,5	2585	46,5	A termo	Microcefalia Grave
MG16	14/11/2015	19 dias	M	29,5	2640	48,0	A termo	Microcefalia Grave
MG17	05/12/2015	2 dias	M	29,5	3850	45,5	A termo	Microcefalia Grave
MG18	05/12/2015	4 dias	F	28,5	2170	40,5	A termo	Microcefalia Grave
MG19	17/10/2015	<1 mês	M	29,0	3300	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG20	12/11/2015	<1 mês	M	30,0	3210	47,0	A termo	Microcefalia Grave
MG21	10/11/2015	<1 mês	F	30,0	3250	47,0	A termo	Microcefalia Grave
MG22	02/12/2015	16 dias	M	30,0	2830	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG24	16/12/2015	2 dias	F	28,0	2320	45,0	A termo	Microcefalia Grave
MG25	22/11/2015	<1 mês	F	26,0	1980	46,0	A termo	Microcefalia Grave

MG26	22/12/2015	6 dias	M	30,0	3225	47,0	A termo	Microcefalia Grave
MG27	26/12/2015	2 dias	F	28,0	2620	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG28	20/12/2015	8 dias	F	29,5	2440	46,5	A termo	Microcefalia Grave
MG29	17/11/2015	<1 mês	F	30,0	3090	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG30	13/11/2015	<1 mês	F	29,5	2790	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG31	29/12/2015	1 dia	F	28,5	2770	49,0	A termo	Microcefalia Grave
MG32	29/12/2015	1 dia	F	29,0	2800	47,5	A termo	Microcefalia Grave
MG33	18/11/2015	8 dias	M	27,5	2690		A termo	Microcefalia Grave
MG34	05/12/2015	6 dias	M	29,0	2600	44,0	A termo	Microcefalia Grave
MG35	11/12/2015	1 dia	F	26,0	1470	41,0	A termo	Microcefalia Grave
MG36	10/12/2015	1 dia	F	30,0	2680	48,0	Pré termo	Microcefalia Grave
MG37	29/12/2015	6 dias	F	28,0	3195	46,0	A termo	Microcefalia Grave
MG38	13/11/2015	<1 mês	F	30,0	2100	42,0	A termo	Microcefalia Grave
MG39	17/11/2015	<1 mês	F	30,0	3010	45,0	Pós termo	Microcefalia Grave
MG41	25/11/2015	<1 mês	F	29,0	3880	48,0	A termo	Microcefalia Grave
MG42	30/11/2015	<1 mês	F	27,0	2910	45,0	A termo	Microcefalia Grave

INFORMAÇÕES LABORATORIAIS

INFORMAÇÕES CLÍNICAS DAS MÃES (período gestacional)			Sífilis	CITOMEGALOVÍRUS (CMV)					
			Soro	CMV IgG (soro)			CMV IgM (soro)		
Febre	Rash	Outros Sintomas	VDRL	Pos	Neg	Kit (método)	Pos	Neg	Kit (método)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado		X	CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado						
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado					X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado						
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado						
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Artralgia; Mialgia; Edema articular	Não detectado						

Não sabe	Sim	Artralgia	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Artralgia	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado		X	CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado					
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado					
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado					
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV-M Liaison (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado					
Não sabe	Não	Não reportado	Não	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)	X	CMV IgM II LIAISON

	reportado		detectado					(Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado					
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado		X	CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Não sabe	Não reportado	Não reportado	Não detectado	X		CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X CMV IgM II LIAISON (Diasorin)
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado					
Sim	Sim	Não reportado	Não detectado		X	CMV IgG II LIAISON (Diasorin)		X CMV IgM II LIAISON (Diasorin)

VÍRUS CHIKUNGUNYA					VÍRUS DENGUE				
CHIKV RT-PCR (LCR)		CHIKV IgM (soro)			DENV RT-PCR (LCR)		DENV IgM (soro)		
Pos	Neg	Pos	Neg	Kit (método)	Pos	Neg	Pos	Neg	Kit (método)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue -IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue Virus IgM Capture DxSelect (Focus Diagnostics)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue Virus IgM Capture DxSelect (Focus Diagnostics)
	X					X			
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue Virus IgM Capture DxSelect (Focus Diagnostics)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue Virus IgM Capture DxSelect (Focus Diagnostics)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X					X			
						X			
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	DENGUE IGM-Capture ELISA (PANBIO)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X					X			
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X			
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	DENGUE IGM-Capture ELISA (PANBIO)
	X					X			
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue Virus IgM Capture DxSelect (Focus Diagnostics)

			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue Virus IgM Capture DxSelect (Focus Diagnostics)
	X					X			
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
	X		X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)		X		X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)
			X	MAC-ELISA (CDC/Atlanta)				X	Dengue IgM - Capture ELISA (Panbio)

PARVOVÍRUS B19					
Parvovirus IgG (soro)			Parvovirus IgM (soro)		
Pos	Neg	Kit (método)	Pos	Neg	Kit (method)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)			
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)			
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X				X	
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)

				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
	X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
				X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)

X		RIDASCREEN Parvovirus B19 IgG (R-Biopharm)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)			
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)			
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)			
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)			
				X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
	X	Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	RIDASCREEN Parvovirus B19 IgM (R-Biopharm)
X		Parvovirus B 19 IgG Enzyme Immunoassay (Biotrin)		X	Parvovirus B 19 IgM Enzyme Immunoassay (Biotrin)

RUBÉOLA					
Rubéola IgG (soro)			Rubéola IgM (soro)		
Pos	Neg	Kit (método)	Pos	Neg	Kit (método)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubéola IgM (Diasorin) (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubéola IgM (Diasorin)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgG (SIEMENS)		X	Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgG (SIEMENS)		X	Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgG (SIEMENS)		X	Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgG (SIEMENS)		X	Enzygnost Anti-Rubella-Vírus/IgM (SIEMENS)
	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)		X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
				X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
	X	Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		ETI-RUBEK-G PLUS (DIASORIN)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
	X	Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)		X	Rubella IgM LIAISON (Diasorin)
X		ETI-RUBEK-G PLUS (DIASORIN)		X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)		X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)		X	Rubella IgM (Diasorin)

X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)	X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
			X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Rubella IgM (Diasorin)
			X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)

X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Rubella IgM (Diasorin)
			X	Rubella IgM (Diasorin)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Rubella IgM (Diasorin)
			X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (SIEMENS)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)	X	Rubéola IgM (Diasorin) (Diasorin)
X		Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgG (SIEMENS)	X	Enzygnost Anti-Rubella-Virus/ IgM (SIEMENS)
X		Eti - RUBEK-G Plus (Diasorin)	X	Rubella IgM LIAISON (Diasorin)

TOXOPLASMOSE						VÍRUS ZIKA				
Toxoplasmosse IgG (soro)			Toxoplasmosse IgM (soro)			ZIKV RT-qPCR (LCR)		Zika IgM (LCR)		
Pos	Neg	Kit	Pos	Neg	Kit (method)	Pos	Neg	Pos	Neg	Kit (método)
									X	in house CDC MAC ELISA
	X	Toxo IgG IMMULITE 2000 - SIEMENS		X	Toxo IgM IMMULITE 2000 - SIEMENS				X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin				X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X			X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IGG II-LIAISON (DIASORIN)		X					X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin				X	in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin				X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X			X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X		X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
									X	in house CDC MAC ELISA
							X		X	in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA

X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
								X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X			X	X		in house CDC MAC ELISA
								X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin	X (in serum)		X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin	X (in serum and urine)		X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X			X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA

	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
X		TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA
							X	X		in house CDC MAC ELISA
	X	TOXO IgG II - Liaison (Diasorin)		X	Toxo IgM LIASON - Diasorin		X	X		in house CDC MAC ELISA

	X	HSV 1/2 IGM Liason (Diasorin)
	X	HSV 1/2 IGM Liason (Diasorin)
	X	HSV 1/2 IGM Liason (Diasorin)
	X	HSV 1/2 IGM Liason (Diasorin)

ANEXO C – ARTIGO COMPLETO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA E COM COMPROVADA RELAÇÃO COM O PROJETO DE TESE



The Transcriptional and Protein Profile From Human Infected Neuroprogenitor Cells Is Strongly Correlated to Zika Virus Microcephaly Cytokines Phenotype Evidencing a Persistent Inflammation in the CNS

OPEN ACCESS

Edited by:
Carl G. Fong,
University of Sydney, Australia

Reviewed by:
Markus Johannes Hofer,
University of Sydney, Australia
Sebastian Stifter,
University of Zurich, Switzerland

***Correspondence:**
Rafael F. O. Franca
rafael.franca@cpqam.fiocruz.br

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 May 2019

Accepted: 30 July 2019

Published: 16 August 2019

Citation:
Lima MC, Mendonça LRd,
Razande AM, Carrera RM,
Anibal-Silva CE, Demers M, D'Aiuto L,
Wood J, Chowdari KV, Griffiths M,
Lucena-Araujo AR, Barral-Netto M,
Azevedo EAN, Alves RW, Farias PCS,
Marques ETA, Castanha PMS,
Donald CL, Kohl A, Nimgaonkar VL
and Franca RFO (2019) The
Transcriptional and Protein Profile
From Human Infected
Neuroprogenitor Cells Is Strongly
Correlated to Zika Virus Microcephaly
Cytokines Phenotype Evidencing a
Persistent Inflammation in the CNS.
Front. Immunol. 10:1928.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01928

Morganna C. Lima^{1†}, Leila R. de Mendonça^{1†}, Antonio M. Rezende^{1†}, Raquel M. Carrera²,
Conceição E. Anibal-Silva¹, Matthew Demers³, Leonardo D'Aiuto³, Joel Wood³,
Kodavali V. Chowdari³, Michael Griffiths³, Antonio R. Lucena-Araujo⁴,
Manoel Barral-Netto⁵, Elisa A. N. Azevedo¹, Renan W. Alves¹, Pablo C. S. Farias¹,
Ernesto T. A. Marques^{1,4}, Priscila M. S. Castanha⁶, Claire L. Donald⁷, Alain Kohl⁷,
Vishwajit L. Nimgaonkar^{3,8} and Rafael F. O. Franca^{1*}

¹ Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil, ² Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, ³ Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, United States, ⁴ Federal University of Pernambuco/UFPE, Recife, Brazil, ⁵ Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Brazil, ⁶ Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States, ⁷ MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom, ⁸ Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States

Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy is associated with microcephaly, a congenital malformation resulting from neuroinflammation and direct effects of virus replication on the developing central nervous system (CNS). However, the exact changes in the affected CNS remain unknown. Here, we show by transcriptome analysis (at 48 h post-infection) and multiplex immune profiling that human induced-neuroprogenitor stem cells (hiNPCs) respond to ZIKV infection with a strong induction of type-I interferons (IFNs) and several type-I IFNs stimulated genes (ISGs), notably cytokines and the pro-apoptotic chemokines CXCL9 and CXCL10. By comparing the inflammatory profile induced by a ZIKV Brazilian strain with an ancestral strain isolated from Cambodia in 2010, we observed that the response magnitude differs among them. Compared to ZIKV/Cambodia, the experimental infection of hiNPCs with ZIKV/Brazil resulted in a diminished induction of ISGs and lower induction of several cytokines (IFN- α , IL-1 α/β , IL-6, IL-8, and IL-15), consequently favoring virus replication. From ZIKV-confirmed infant microcephaly cases, we detected a similar profile characterized by the presence of IFN- α , CXCL10, and CXCL9 in cerebrospinal fluid (CSF) samples collected after birth, evidencing a sustained CNS inflammation. Altogether, our data suggest that the CNS may be directly affected due to an unbalanced and chronic local inflammatory response, elicited by ZIKV infection, which contributes to damage to the fetal brain.

Keywords: Zika virus, central nervous system, inflammation, type-I interferon, interferonopathy, microcephaly, Zika congenital syndrome and cytokines

INTRODUCTION

Congenital Zika Syndrome (CZS) comprise a wide spectrum of birth defects and symptoms observed in infants who have been exposed to Zika virus (ZIKV) during embryonic development (1). Although other minor abnormalities have been documented, the most dramatic symptoms are microcephaly, severe microcephaly, arthrogryposis, and ocular damage (2). Microcephaly is characterized as a developmental brain malformation that results in a cranial circumference <2 standard deviations (2-SD) below the average for the same sex and gestational age, on the same way, severe microcephaly is classified based on a cranial circumference <3 -SD below the average (3, 4). Microcephaly associated with ZIKV infection in pregnancy was first reported in Brazil in 2015 during a large outbreak of this virus (5). Initial associations between ZIKV infection and microcephaly development were based on the identification of viral RNA in fetal amniotic fluid (6) and in the brain tissue of fetuses and infants diagnosed with microcephaly (7, 8). Later, several reports from independent groups confirmed the association between ZIKV infection during pregnancy and congenital abnormalities (9).

Diagnosis of CZS is complex and involves several different steps, including taking head circumference measurements, neurological evaluation, radiologic brain imaging and ophthalmologic assessment. ZIKV exposure confirmation can be accomplished using molecular and serologic standard methods. However, since ZIKV is present in body fluids with different shedding kinetics, confirmation of virus infection remains challenging (10). In neonates presenting with signs of microcephaly, ZIKV infection can be confirmed by virus detection (i.e., RT-PCR) or by the presence of ZIKV-specific IgM in cerebrospinal fluid (CSF) or serum (4, 11). Importantly, the presence of anti-ZIKV IgM in the CSF of neonates with suspected CZS is a strong indicator of a recent congenital infection (12). Although significant improvements have been reached in terms of diagnosis, the exact pathogenic mechanisms related to ZIKV-induced microcephaly and others malformations remain largely unknown. Emerging evidence demonstrated that ZIKV infection impairs brain development by arresting cellular neurogenesis, leading to the deregulation of cell-cycle progression and apoptosis (13–16). Moreover, previous work has also assessed the birth defects resulting from ZIKV exposure in different pregnant mouse models (17–20). While most studies are focused on elucidating the specific cellular mechanisms of ZIKV pathogenesis through *in vitro* or *in vivo* models, the pathogenesis among naturally infected human subjects and its biological implications have not been investigated to the same extent.

In humans, the central nervous system (CNS) becomes to be established from 22 days onwards. Initially, the embryonic brain is entirely composed of highly proliferative neuronal progenitor cells (NPCs). Thus, at this stage, pathogenic processes induced by the unbalanced production and local secretion of immunoregulatory molecules may lead to reduced brain size, and consequently microcephaly (21). Therefore, investigations into ZIKV triggered immune responses, especially in the CNS, may

contribute to a better understanding of the disease mechanisms since specific immune mediators may play a major role in the pathogenesis of microcephaly. The finding that ZIKV infection leads to apoptosis in different neuronal models could also partially explain the cellular destruction observed in the radiological examination of neonates with CZS (22). On the other hand, the paracrine effects of cytokines and chemokines directly secreted in the CNS by the infected cells are still unknown. More recently, Tappe et al. (23) assessed cytokine kinetics in the serum of ZIKV infected patients. Despite the relatively small number of patients analyzed, the authors were able to compare samples from the acute and convalescent-phase, observing elevated levels of the chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 during the recovery phase. During the acute phase, the authors observed a mixed cytokine pattern, with the increase of cytokines profiles associated with Th1, Th2, Th17, and Th9 CD4⁺ T cell responses (23). In addition, it was reported that there were increased levels of CXCL10 and CCL2, IL-6, IL-8, VEGF, and G-CSF in the amniotic fluid of ZIKV-positive pregnant women with neonatal microcephaly (24). Furthermore, the overexpression of CXCL10 was recently identified as a potential serum biomarker of acute ZIKV infection (25). Taken together, these findings may suggest that ZIKV infection results in a specific pro-inflammatory profile. However, no reports from microcephaly cases were available so far, and it remains to be elucidated whether ZIKV-induced microcephaly could be associated with an organ-specific inflammation.

Here, we analyzed the transcriptional changes induced by ZIKV infection in human induced pluripotent neuroprogenitor stem cells (hiNPCs). We used this model to compare the pathogenesis of a contemporary South American strain (isolated in Brazil in 2015 at the peak of microcephaly cases) vs. an ancestral Asian strain isolated in Cambodia in 2010. Transcriptional data were further confirmed at protein expression levels and by assessing the levels of cytokines and chemokines in the CNS of confirmed ZIKV-induced microcephaly cases and validated through a second *in vitro* infection assay in human neuroblastoma cells. Our findings suggest an important role of type-I interferon (IFN) response and chemokines CXCL10 and CXCL9 in the pathogenesis of microcephaly, which may represent a still unaddressed target with the potential to interrupt the destructive CNS inflammation induced by ZIKV infection.

METHODS

hiNPCs Culture and Infection

Human induced neuroprogenitor cells (hiNPCs) derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), line 73-56010-02 sub-clone F₁ were grown on matrigel-coated, cell culture treated plates. Briefly, hiPSCs, were cultured with neuronal precursor selection medium, followed by neuronal precursor expansion medium (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) containing fibroblast growth factor 2 (R&D Systems, Minnesota, USA) for the generation of neural stem cells. After 5–7 days in culture, neural rosettes were identified, manually dissected and plated into low-attachment plates where embryoid

body-like structures—denoted as neurospheres—emerged. Following the plating of neurospheres into the matrigel-coated plates, hiNPCs were collected manually for monolayer culture. hiNPCs were then cultured in neurobasal medium containing B27 (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) supplement and brain-derived neurotrophic factor 10 ng/mL (R&D Systems, Minnesota, USA) for neuronal differentiation. hiNPCs cultured cells, passage 5, were grown until 85% confluent in 12-well plates and further infected at (multiplicity of infection) MOI 1 with a ZIKV Brazilian strain (ZIKV/*H.sapiens/Brazil/PE243/2015*, GenBank: KX197192.1), previously described (26) or a ZIKV Cambodian strain (Zika virus isolate Cambodia FSS13025/2010, GenBank: JN860885.1) prepared in Vero E6 cells, previously established in our laboratory. At 1-h post infection, the inoculation medium was removed and replaced with culture medium. At 48 h post infection, the cells were harvested and RNA was extracted for RNA-sequencing (RNA-Seq) and transcriptomic analysis.

RNA-Seq and Data Analysis

RNA-Seq was performed at the Genomics Research Core, University of Pittsburgh, USA. Before sequencing, RNA quality was checked using the Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Whole-transcriptome sequencing was performed using the TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with an average of 49.1 million reads per library. Each condition (infected and control samples) was sequenced in triplicate. The quality of sequenced reads was assessed by FastQC tool. Reads from each library were mapped against the human genome assembly GRCh38 with the annotation version 91 downloaded from the Ensembl database, applying the STAR aligner version 2.5.3. Later, R package DESeq2 was used to perform differential expression analysis (DEA). During this step, the biological replicates from infected and control samples were compared, but only genes presenting at least ten reads for all three biological replicates in at least one condition were considered for DEA. Genes with an absolute value of \log_2 fold change equal to or >1 and with a p -value, correct by the FDR approach, of <0.05 were selected for functional analysis using the STRINGdb R package (<http://www.string-db.org>) and KEGG REST for pathway-based data integration (<https://www.kegg.jp/kegg/rest/>). The former was used to assign Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway terms to differentially expressed genes (DEGs). In addition, the *Biological Process* ontology of GO was employed to perform a functional enrichment analysis for those genes. KEGG pathways were grouped into four categories (adaptive immune response, cytokine and chemokine signaling, interferon response, and cell death and growth) to visualize protein networks present in the STRING database. The protein networks built from the lists of DEGs were analyzed using Cytoscape software, version 3.6.0 (<https://cytoscape.org/>). Heatmaps were built using the gene counts normalized by the library size factors using the function heatmap of R environment. The mean of gene expression fold change from infected cell samples were plotted vs. the expression found in non-infected ones (Control) and visualized with ViaComplex software (27)

(<http://lief.if.ufrgs.br/pub/biossoftwares/viacomplex>). For this analysis, we selected only the list of modulated genes identified in Figure 2A.

Infection of Neuroblastoma Cells and Cytokine Analysis

Human undifferentiated neuroblastoma cells (cell line SH-SY5Y-ATCC[®] CRL-2266[™]) was cultured in 1:1 MEM and Ham's F12 Nutrient Mixture, supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mmol/L L-Glutamine, non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific) and 10% (v/v) fetal bovine serum in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Cells were infected with ZIKV/Brazil (ZIKV/*H.sapiens/Brazil/PE243/2015*, GenBank: KX197192.1) and analyzed at different days post-infection (dpi), as described on figure legends. Briefly, cells were harvested at 2 dpi and stained with anti-flavivirus envelope (E) protein primary antibody (4G2) and goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated with FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), and analyzed by flow cytometry (FACS). Supernatants were harvested and processed for viral RNA extraction and qRT-PCR assays in several time points post-infection. In addition, supernatants were also harvested at 3 dpi and soluble cytokines and chemokines were quantified by the kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine and Human Chemokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Patients

Cases of microcephaly and other birth defects enclosing the CZS cases notified from 2015 to 2017 were investigated following a previously established protocol from the Brazilian Ministry of Health as follows: neonates with suspected microcephaly were investigated by measuring their head circumference. Those with a circumference of at least 2 SD below the mean for the same sex and gestational age on the Fenton growth chart were diagnosed with microcephaly. Severe microcephaly was diagnosed in those infants who presented with a head circumference smaller than 3 SD. Brain imaging was performed whenever possible. Control subjects were live neonates with suspected microcephaly at birth who had a CSF sample collected to perform ZIKV diagnosis, which were later classified as healthy through transfontanelar ultrasonography of the brain and which presented no other major birth defects. Exclusion criteria were anencephaly, encephalocele, and the confirmation of the phenotype of a well-defined congenital syndrome. Congenital infections, other than ZIKV, were assessed in infants and mothers from a blood sample collected right after birth by the STORCH laboratory-testing panel (congenital infections encompassing syphilis, toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus and herpes simplex virus). CSF samples from all neonate CZS suspected cases were collected by lumbar puncture, samples collected at a maximum of 4 weeks after birth were included in this study. For ZIKV infection confirmation, CSF samples were forwarded to the Arbovirus Reference Laboratory at the Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz/Recife, Brazil. ZIKV infection was diagnosed by detection of IgM antibodies or by ZIKV RNA presence determined by Real Time RT-PCR (rRT-PCR). ZIKV

exposure was confirmed based on a positive laboratory result from CSF and/or serum.

Multiplex Immunoassays

Individual cytokines in all human neonate CSF samples were assayed in a Luminex Platform employing a commercially available kit: Cytokine Human Magnetic 25-Plex Panel (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) following the manufacturer's instructions. hiNPC-derived infected supernatants were virus-inactivated by homogenizing samples in NP-40 at 0.2% and analyzed by the Human Cytokine 42-Plex Discovery Assay (Eve Technologies, Calgary, Canada). A complete list of the analyzed cytokines and chemokines and its detection limits are described in Supplementary Material (Tables S2, S3).

Ethics Statement

Ethics protocol and procedures have been reviewed and approved by Institutional Ethics and Research Committee of the Instituto Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation-Fiocruz, Brazil (CAAE: 73669417.7.0000.5190). The hiNPC-based studies were approved by the University of Pittsburgh internal IRB and IBC.

ZIKV ELISA IgM

ZIKV IgM antibodies were detected by MAC-ELISA (Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), employing an in-house protocol. Briefly, ZIKV antigen was prepared from ZIKV-infected Vero E6 cells. ELISA plates were sensitized with Goat anti-human-IgM (KPL/Sera Care, Milford, USA), before samples were added (1/400 dilution). Reactions were performed employing a detection antibody (MAB 6B6C-1/HRP), kindly provided by CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Serum and CSF samples were considered positive when the optical density exceeded 3.0 times that of the negative control.

Virus Detection—Real-Time RT-PCR and Plaque Assays

Viral RNA was extracted manually from human serum and CSF samples using a QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. ZIKV Real Time RT-PCR (rRT-PCR) reactions were performed from purified RNA serum samples employing primers and probes as described by Lanciotti et al. (28). Briefly, reactions were performed in duplicate in a final volume of 20 μ l employing the kit GoTaq[®] Probe 1-Step RT-qPCR (Promega Corporation, Madison, USA), following manufacturer instructions. Cycling was performed using the QuantStudio 5 Real-Time system (Thermo Fisher Scientific) and samples with a Ct value <38 in duplicate wells were considered to be positive for ZIKV. For quantitative Real Time RT-PCR assays (RT-qPCR) a standard curve for ZIKV RNA copies was prepared from a previously titrated virus stock (range 10^1 to 10^6 PFU/mL). Plaque assays were performed on Vero E6 cells. Briefly, cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per well in standard 24 well plates and infected with serial dilutions of either cell culture supernatant from infected hiNPCs or virus stocks (for virus titration assays). After 2 h at 37°C the inoculum was

removed and the cells were washed with PBS. Then the cellular monolayers were overlaid with DMEM 2% containing 1.5% CMC (carboxymethyl cellulose). Five to seven days later, the wells were washed with PBS. Afterwards, the cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min and stained with 0.1% crystal violet for plaque visualization.

Statistical Analysis

The Mann-Whitney unpaired test was used to compare continuous variables. Results were expressed as Tukey box-and-whisker plots showing median, upper and lower quartile, minimum, and maximum values. Outliers are represented by dots outside the 1.5 interquartile range of the 25 respective 75 percentile. All *p*-values were two sided with a significance level of 0.05. Calculations were performed using GraphPad Prism 7 software. Cytokines and chemokines data are represented by mean \pm SD. Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test using the GraphPad 7 software.

RESULTS

Transcriptional Changes in ZIKV-Infected hiNPCs

To identify the transcriptional profile that may account for the differentially activated host response during infection with a contemporary vs. an ancestral ZIKV Asian strain, here denominated ZIKV/Brazil and ZIKV/Cambodia, respectively, hiNPCs were infected, and after 48 h total RNA was extracted and analyzed using the Illumina NextSeq 550 sequencing platform. Figure 1A shows the global expression changes, represented by normalized RNA-Seq read counts among all the transcripts identified as significantly changed, only if the fold change (\log_2) was >2 (up or down) and the corrected *P*-value was less or equal than 0.05, in comparison to the control group. Overall, of all the identified genes, both strains induced profound transcriptional modifications. Thus, to better classify those genes that may account for the different immune response induced by both strains, we categorized these identified transcripts according to KEGG pathways. The clusters of differentially expressed genes that were either up or downregulated included several key cellular processes that were related to adaptive immune response, cytokine and chemokine signaling, interferon response, and cell death and growth (Figures 1B–E). Among the modulation on genes induced by both strains, we identified the upregulation of innate immune regulatory molecules, including several C-X-C motif chemokines, *STAT* genes, *MAPK* pathway, as well as transcripts for *TLR3*, *IRF7*, and other type-I IFN pathway-related genes. Adaptive immune response genes were also upregulated (Figure 1B). Comparative analysis of the transcriptional signature of infected hiNPCs demonstrated that ZIKV/Cambodia infection resulted in a higher modulation of specific gene clusters, including several C-X-C motif chemokines and type-I IFN response genes (Figures 1C,D). On the other hand, ZIKV/Brazil induced a more pronounced modulation of cell death and cell growth-related genes (Figure 1E).

Predictive network analysis suggested that a significant portion of the differentially up-regulated genes comprehends

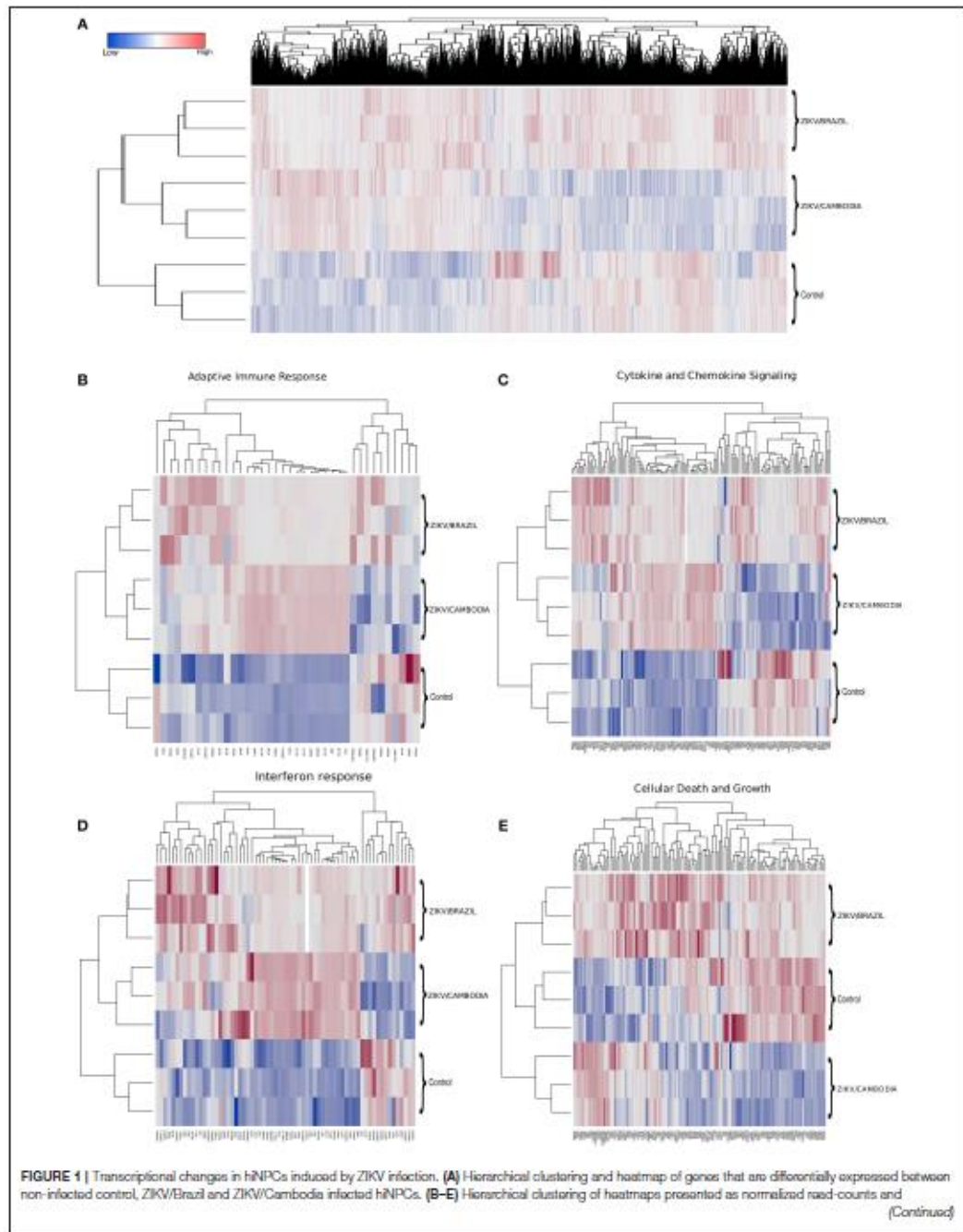
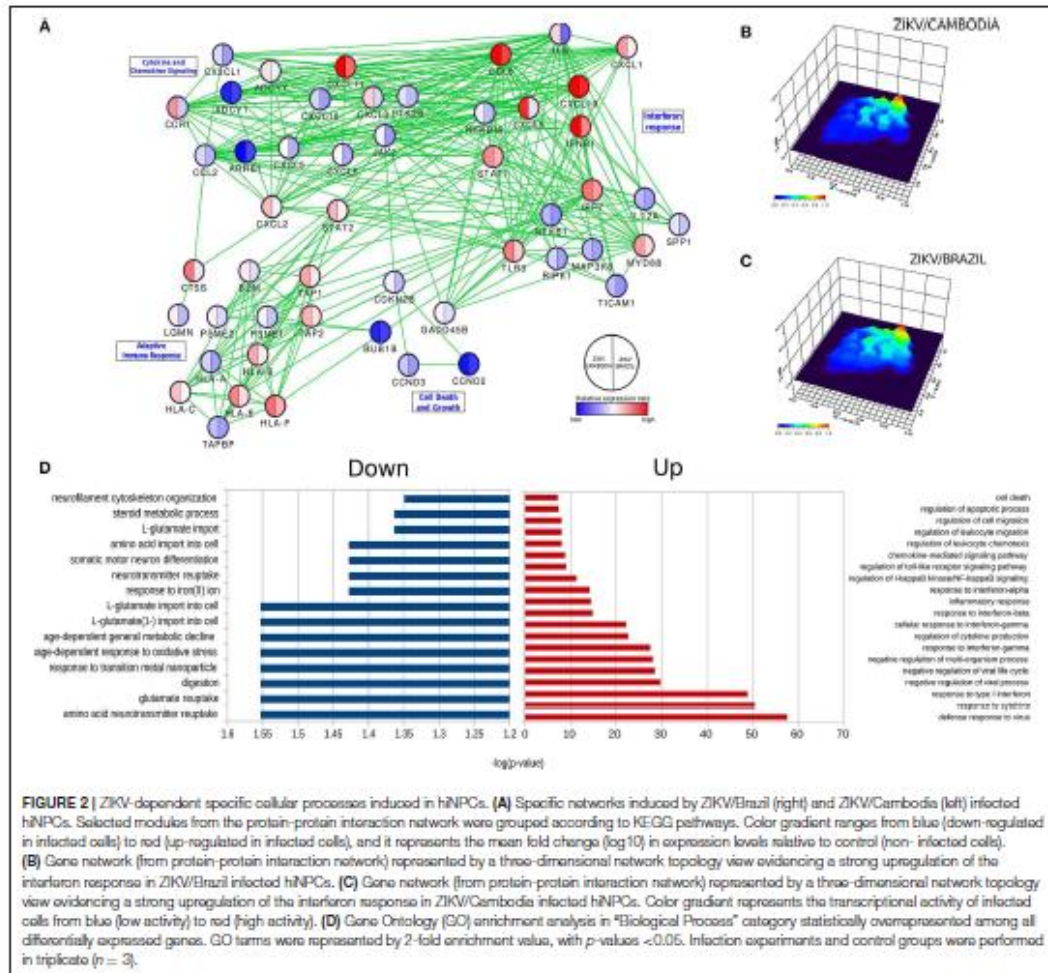
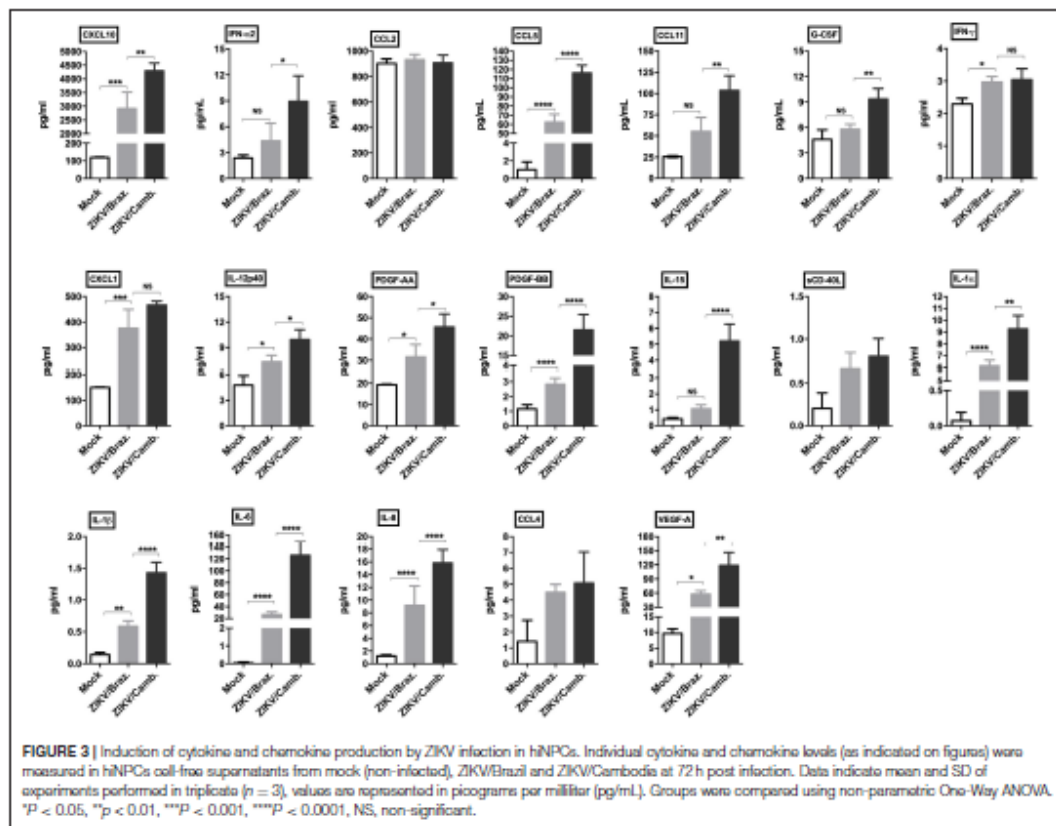


FIGURE 1 | represented according to different groups of KEGG analyzed pathways. **(B)** Adaptive immune response, **(C)** Cytokine and chemokine signaling, **(D)** Interferon response, **(E)** Cell death and growth. Heatmaps are representative of all identified expressed transcripts, scale bar represents gene expression of normalized reads counts for each individual triplicate. Color gradient ranges from blue (low RNA-Seq read counts) to red (high RNA-Seq read counts). Single panel lines are representative of individual infection experiments as stated for ZIKV/Brazil, ZIKV/Cambodia and control group ($n = 3$). Also see **Figures S2–S4**, which represent STRING functional protein networks analysis for the genes represented in the heatmaps.



a set of common pathways (Figure 2A and Figures S1–S4). Overall, the majority of genes that displayed a significant difference between control and infected cells were upregulated (Figure 2D). With regards to downregulated pathways, we observed changes mostly in genes related to metabolism and neurotransmitters (Figure 2D). Among all these processes there was a highly up-regulated notable gene cluster, the type-I

IFN response. This cluster includes transcripts for *IFNB1*, *STAT1*, *IRF3*, *IFNAR2*, *IRF7*, and *TLR3* (Figures 1D, 2D). Other transcripts were also detected at increased levels, including chemokine transcripts *CXCL9*, *CXCL10* (among the top-ranked expressed genes), *CXCL1*, and *CCL5*. The network of highly modulated genes was further analyzed with the ViaComplex software, which compared the transcriptional profile of infected



vs. uninfected cells plotting the mean expression values (Z-axis) as a 3D landscape topographical view, this analysis showed the cluster of type-I IFN response as the highest level of expression induced by infection (Figures 2B,C). In general, both strains were able to upregulate the type-I IFN response, however, we found that ZIKV/Cambodia induced a more robust modulation. Together, these results suggest that the ZIKV induced transcriptional changes are, at least in part, strain dependent.

To confirm this inflammatory transcriptional profile we quantified the concentration of cytokines, chemokines and growth factors in hiNPCs supernatants through a multiplex assay, which included several soluble markers. We compared the levels of these markers induced after infection by both strains in a single time point (72 hpi). We observed a strong significant modulation of the pro-inflammatory cytokines IL-1 α/β , IL-6, and IL-8, and the chemokines CCL5, CXCL10, and CXCL1, induced by both strains. ZIKV/Cambodia induced significantly higher levels of IFN- $\alpha 2$, compared to ZIKV/Brazil infected hiNPCs. Also, ZIKV/Cambodia infection was associated

with significantly enhanced levels of CXCL10, CCL5, CCL11 and the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-12p40, and IL-1 α/β (Figure 3). Overall, inflammatory markers assessed by this analysis correlated with the transcriptional profiles in infected hiNPCs.

To further explore if the enhanced inflammatory activity from ZIKV/Cambodia infected cells was associated with a difference in virus replication, we quantified the average reads depth of the ZIKV genome from infected and non-infected hiNPCs. As expected, no ZIKV genome reads were observed in the control group (Figure 4A). However, nearly complete ZIKV genomes were recovered from infected hiNPCs, with a high coverage from both strains (coverage above 99.9%). NGS results demonstrated that ZIKV/Cambodia gave a much lower read counts average (depth below 10,000) compared to ZIKV/Brazil infected cells (depth above 10,000) (Figures 4B,C). Albeit lower, ZIKV/Cambodia sequencing depth RNA levels, were not correlated to a significant increased viral load (infectious particles) in infected hiNPCs supernatants, analyzed at 48 hpi (Figure 4D). Thus, despite the minor differences in

virus replication, it is suggestive that the magnitude of the inflammatory response may interfere with the viral titers, though key pathways are activated regardless of the virus strain.

ZIKV Infection of Human Neuroblastoma Cells Also Induce Chemokines Release

Given the ability of ZIKV infection to up-regulate chemokines and cytokines transcripts in hiNPCs, we determined the susceptibility of a distinct neuronal cell line. For this, we opted to evaluate the feasibility of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y cells) to respond to ZIKV infection by increasing cytokines/chemokines production. First, to confirm infection, undifferentiated SH-SY5Y cells were infected and analyzed by FACS at 2 dpi, positive viral envelope protein (E) staining was observed in a large percentage (65.1%) of the infected cells (Figure 5A) and viral RNA, detected in the supernatant, increased over time (Figure 5B), confirming that these cells were susceptible to infection. Next, we evaluated the presence of a set of cytokines and chemokines in the supernatants using two different sets of human CBA assays. The results show increased production of IL-8, CXCL10, CCL2, CCL5, and IL-6 (Figure 5C) at 3 dpi, indicating the ability to induce an active pro-inflammatory response. No other cytokines were detected at significantly increased levels (data not shown). Infection also results in enhanced expression of several IFN stimulated genes, especially *IFNA1*, *IFNB1*, and *TLR3* transcripts (Figure 5D).

CNS Inflammatory Profile of ZIKV Confirmed Microcephaly Cases

The increased type-I IFN and chemokine responses observed from ZIKV infection are common features of viral infections including ZIKV, however, in the CNS, a hyperactivation or a sustained inflammatory process may result in extensive tissue damage, especially in the context of a developing brain. Thus, to better characterize the ZIKV inflammatory profile we assessed the CNS immune profile of confirmed ZIKV-induced microcephaly and severe microcephaly human cases (here, collectively denominated "microcephaly"). From a total 2,334 CZS suspected cases from September 2015 to May 2016 in Northeastern Brazil, we were able to identify 27 healthy control patients (no brain alterations) and 51 cases of microcephaly, based on clinical diagnosis, with CSF sample availability (characterized by a previous collected sample stored at the laboratory). Among the microcephaly cases included in our study, 40 (78.4%) were diagnosed as severe microcephaly (head circumference <3 SD on the Fenton growth chart) and 11 as microcephaly (head circumference <2 SD). Complete information and patient characteristics and laboratory results are summarized in Table 1. Additional laboratory data are summarized in Table S1 and Supplementary Material. ZIKV infection was diagnosed by the presence of anti-ZIKV IgM in the CSF in all of the 51 confirmed microcephaly cases. Among these 51 cases, the presence of ZIKV RNA (rRT-PCR) was identified in only two samples (Table S1). Importantly, no positive anti-ZIKV IgM or rRT-PCR CSF samples were observed in the healthy control group. STORCH testing for

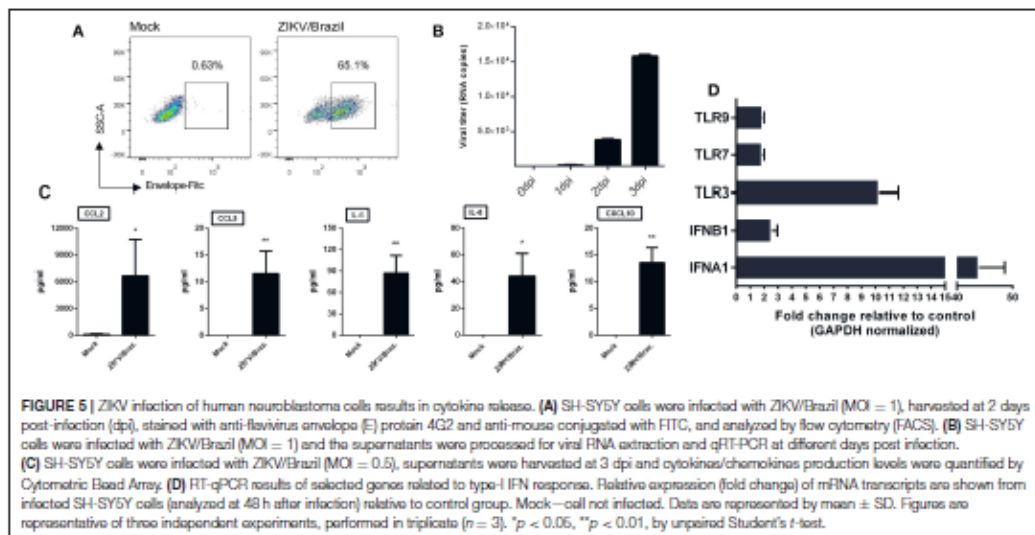
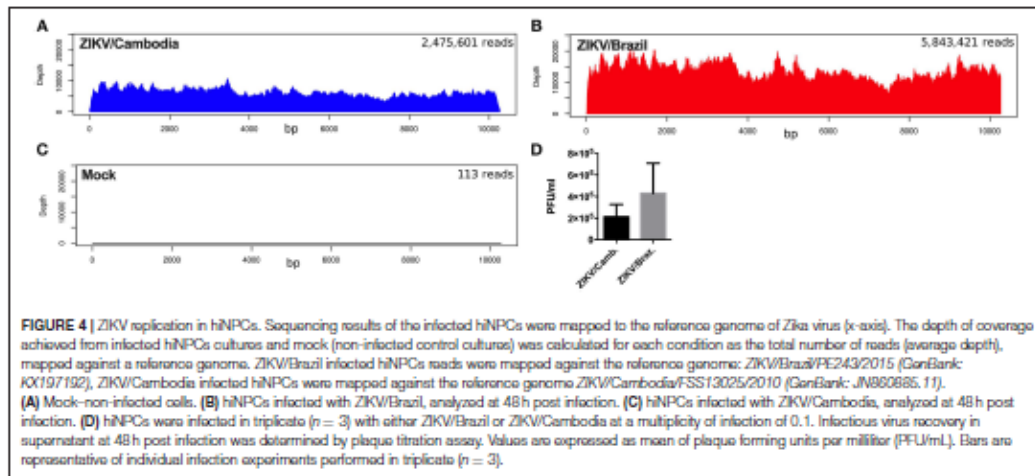
TABLE 1 | Characteristics of patients included in the study.

	Healthy control	Microcephaly
Neonates, total number of subjects (%)	27 subjects	51 patients
Male	10 (37)	22 (43)
Female	17 (63)	29 (57)
Gestational age at birth, (%)		
Pre-term	5 (18.5)	5 (9.8)
Term	21 (77.8)	44 (86.2)
Post-term	1 (3.7)	2 (4)
Birth weight, grams (%)		
>2,500 g	19 (70.4)	39 (76.5)
>1,500-2,499.9 g	8 (29.6)	10 (19.6)
<1,500 g	0	1 (1.95)
Not informed	0	1 (1.95)
Head circumference (%)		
Normal	27 (100)	0
<2 SD (microcephaly)	0	11 (21.6)
<3 SD (severe microcephaly)	0	40 (78.4)
Mothers (total number of subjects)	27	51
Reported rash during pregnancy (%)		
No rash	26 (96.3)	35 (68.6)
First trimester	0	9 (17.6)
Second trimester	1 (3.7)	1 (1.95)
Third trimester	0	3 (5.9)
Yes, unknown period	0	3 (5.9)

A total of 27 neonates with a discarded diagnosis of microcephaly (healthy controls) were included in this study. Among the confirmed microcephaly and severe microcephaly cases, a total of 51 neonates, which had CSF samples available, were included for further cytokine investigation. All of the neonates had CSF samples collected no later than 4 weeks after birth.

common congenital infections was performed for all subjects, and no IgM reactive samples were documented (Table S1 and Supplementary Material). Based on this, other congenital common infections were ruled out, and the final diagnosis was microcephaly associated with maternal ZIKV infection.

CSF samples from healthy control subjects and microcephaly neonate cases were analyzed employing a panel of 25 different human cytokines and chemokines. Through our analysis, microcephaly-associated CSF samples showed significantly higher levels of IFN- α ($p = 0.0428$), compared to the control group. Albeit slightly higher, there was no significant difference in the levels of IL- β and IL-1RA ($p = 0.054$ and $p = 0.10$, respectively). The pro-inflammatory cytokines IFN- γ , IL-6, and IL-8 were similar between the groups. Among chemokines, we did not observe a significant difference in the levels of CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, and CCL11. Interestingly, consistent with the *in vitro* results, two CXC chemokine ligands were found at significantly higher levels in the CSF samples from microcephaly cases: CXCL9 and CXCL10 ($p = 0.028$, and $p = 0.0003$, respectively). Among T-cell activation related cytokines, we did not observe a cytokine signature associated with a predominant

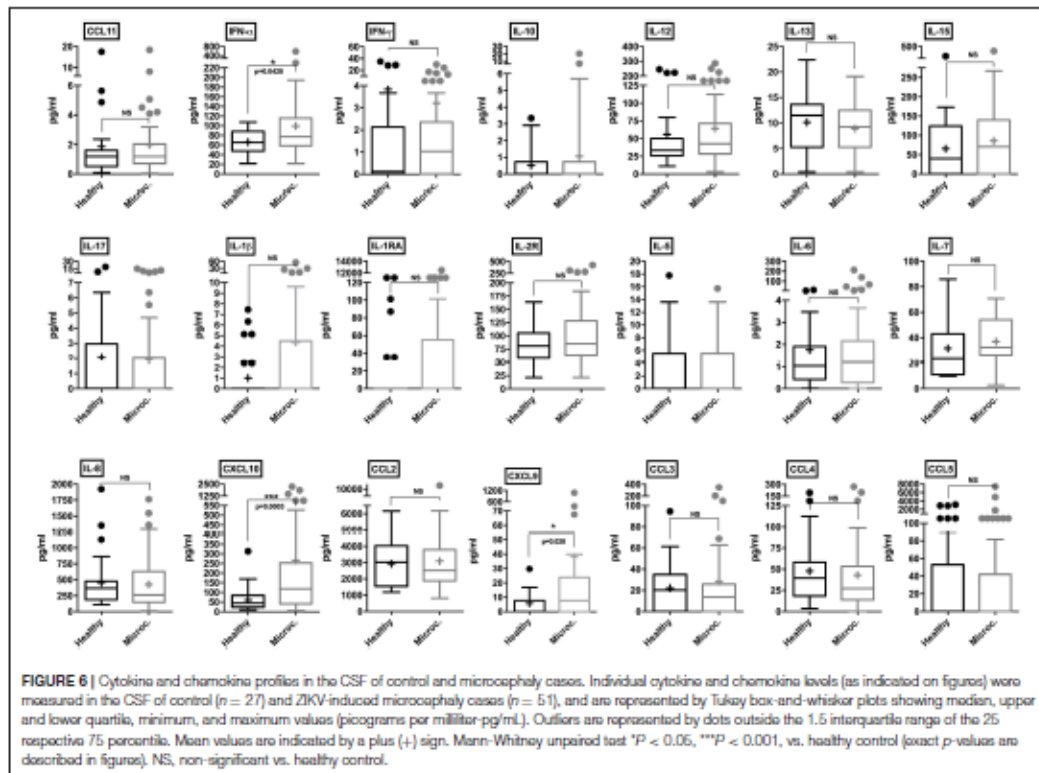


helper T-cell response. We also observed no difference in IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, and interleukin-2 receptor (IL-2R) production between microcephaly cases compared to the control group (Figure 6). Four cytokines (GM-CSF, TNF- α , IL-2, and IL-4) were below the detection limit (data not shown). Altogether, these observations show that the transcriptional changes induced by ZIKV infection results in respective protein levels increase *in vitro* and that this inflammatory signature is also present in the CNS of ZIKV-induced microcephaly cases. Moreover, our data suggest that children suffering

from ZIKV-induced microcephaly may experience long-term or chronic neuroinflammation.

DISCUSSION

Currently, the underlying pathophysiological mechanisms of ZIKV-induced microcephaly and CZS remain poorly understood. It has been documented that ZIKV infection leads to a reduction in NPCs numbers as a result of apoptosis (29), cell cycle arrest (30), and premature differentiation (31),



consequently impairing neuronal development. Although NPCs are the main targets of ZIKV replication effects, infection in isolated cell models are frequently underexplored regarding inflammatory responses (32). Here, we employed different approaches to better characterize the CNS inflammatory response induced by ZIKV infection. First, through the use of hiNPCs, we observed a strain-dependent modulation of host genes, including the induction of several ISGs. Next, we confirmed that experimental infection of hiNPCs leads to extensive chemokine and cytokine release, consistent with the induced transcriptional profile. Since the manipulation of stem cells may result in differentiation variability between distinct cell lines, laboratories and in variations in differentiation efficiency (33), we opted to include a second cell line to model ZIKV infection. Human neuroblastoma cells have the advantage of being inexpensive, consistent and reproducible neuronal cell model (34). These cells supported a productive ZIKV replication cycle, with a similar inflammatory profile. However, an important finding from our work is that the *ex vivo* profiling of the CNS inflammation in ZIKV-induced microcephaly infants supports our *in vitro* experimental data.

As reported by others, the inflammatory response elicited by ZIKV is strain-dependent, where African induces a much higher inflammatory response than Asian strains (35). Additionally, African strains are less effective in inhibiting type-I IFN responses (36). In our model, we found a specific signature induced by ZIKV/Brazil, a previously characterized South American strain (26). Importantly, this virus was isolated from a highly endemic area (northeastern Brazil), concomitantly at the peak of microcephaly cases in 2015. Thus, we can assume that ZIKV/Brazil represents a virus strain-specificity (same strain circulating during the initial microcephaly outbreak). Evidently, infection with both strains led to an inflammatory immune response in hiNPCs, however differences in the magnitude of inflammatory cytokines were found to be strain-specific, which may help to explain why a higher incidence of microcephaly was first observed in northeastern Brazil. A reasonable explanation is that the lower magnitude of inflammation induced by the innate immune responses may inefficiently limit viral replication, since the reduced type-I IFN response may result in augmented higher viral burden or chronification of the infection. Interestingly, as reported by others, ZIKV Brazilian strains share characteristics of viruses that do not induce a robust innate immune activation

(37), which may render these strains more effective at establishing a persistent infection or increased capacity to cross the placenta and/or to invade the CNS. Here, although ZIKV RNA levels were significantly lower in ZIKV/Cambodia compared to ZIKV/Brazil infected hiNPCs, we observed only a slight difference in the presence of infectious virus at 48 hpi, and thus a complete virus growth curve would be more enlightening. Therefore, our results contribute to a better understanding of ZIKV immunopathological processes, and they are in agreement with a previous report where an American strain of ZIKV results in an enhanced viral load and a more severe microcephaly phenotype in mice (38). Importantly, as demonstrated in an independent study, a distinct ZIKV Brazilian strain showed a delayed production of infectious virus *in vitro*. By comparing ZIKV/Cambodia to ZIKV Brazil Fortaleza (*GenBank: KC811222*) the authors found that ZIKV/Brazil reached a virus production peak at a later time point (72 h), whereas in early times this difference was not so evident (37).

Through the transcriptional profile analysis and multiplex immunoassays, we identified key major cellular signaling pathways and inflammatory markers. Transcriptomic data of experimentally ZIKV infected cells have been generated by several independent groups (39–41), however, given the large variability of the cell lines employed, time of infection, virus strains and amount of infectious particles on each approach, combinatory analysis of such data becomes challenging. We demonstrated that IFN- α , CXCL10, and CXCL9 levels were significantly higher in CSF samples obtained from ZIKV-induced microcephaly cases, compared to healthy control subjects. It is important to note that all CSF sampling was performed right after birth, up to a maximum of 4 weeks of life, ensuring that the presence of soluble immune mediators is representative of a sustained inflammatory process. High variation in expression levels of a few cytokines (notably IL-1 β and IL-1RA) was observed, potentially demonstrating that we missed the detection of specific perturbations as the result of a single time point sampling (after birth). Also, several cytokines were below the detection limit, indicating their low levels of expression in the CSF. We could not predict exactly when the infection occurred, which may explain some of the variations observed. However, even though the virus was not detected in most of the subjects analyzed, as illustrated by the large proportion of rRT-PCR negative CSF samples, we can assume that the resulting inflammation is persistent.

Remarkably, several different congenital infections lead to a common clinical presentation, collectively denominated TORCH (Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus, and Herpes) these congenital infections also result in microcephaly and cerebral calcifications. Overall, these pathogens are highly neurotropic, but first, they must cross the placenta to induce fetal damage (42). Currently, it remains unclear how ZIKV can reach the fetal compartment, as well as the exact fetal tissues targeted. Albeit ZIKV antigens and viral RNA were detected almost exclusively in the brains of infants and fetuses with microcephaly (7, 8, 43) no descriptions regarding the neural tissue inflammation has been reported. Interestingly, Aicardi-Goutières syndrome (AGS) resembles the clinical findings

of ZIKV-induced microcephaly. AGS patients present brain calcifications, changes in white matter, cerebral atrophy and the laboratory findings include increased levels of IFN- α in the CSF (44). Mechanistically, AGS patients have been classified in the group of type-I interferonopathies, which comprise a group of genetic (Mendelian) disorders caused by a sustained type-I IFN response during the embryonic development. Experimentally, the chronic exposure of astrocytes to high levels of IFN- α resulted in reduced cell proliferation, increase in antigen-presenting genes and down-regulation of pro-angiogenic factors (45). Besides, the transgenic expression of IFN- α in the CNS of mice induces inflammation and neurodegeneration, similar to that seen in AGS (46–48). Based on this we can assume that the sustained levels of type-I IFN, here described, may play a role in ZIKV-induced microcephaly contributing to the induction of detrimental developmental effects.

Recently published reports from animal models, which explored the effects of ZIKV during pregnancy, required the blockade of type-I IFNs to achieve susceptible hosts (19, 49). Thus, the absence of type-I IFN signaling in ZIKV animal experiments lacks an important component in studies related to ZIKV immunopathogenesis. In agreement with our data, the induction of type-I IFN signaling, as a result of ZIKV infection in mice, led to increased apoptosis in the placental labyrinth, abnormal maternal-fetal barrier, and fetal hypoxia. Moreover, type-I IFN treatment of human midgestation villous explants led to abnormal villous structures, which are strongly associated with growth restriction and spontaneous abortions (50). Albeit of great relevance, the authors explored the effects of type-I IFNs exclusively on the developing placenta. Here, we propose that type-I IFNs may play an important role in developmental defects caused by ZIKV, specifically in the context of brain damage, as a result of chronic local inflammation.

As reported, ZIKV non-structural proteins are effective in inhibiting type-I IFN, which favors virus replication and may lead to viral persistence in different body compartments (51–53). In fact, recent reports describe ZIKV persistence in infants (54, 55) and adults (56). Here, we hypothesize that peripheral type-I IFN inhibition is an essential step that facilitates CNS invasion. Once in the CNS, the virus induces a sustained, suboptimal type-I IFN response that leads to extensive neuroinflammation and tissue injury. Interestingly, activation of type-I IFN signaling in brain endothelial and epithelial barriers results in CXCL10 release into the brain parenchyma and this signaling cascade was recently correlated to "sickness behavior," a common set of symptoms due to viral infections (57). Of note, CXCL10 and CXCL9 can be induced by both, type-II (IFN- γ) and type-I IFNs (58). Increased levels of IFN- α and CXCL10 in the CSF of AGS patients were already documented, and these findings were associated with the absence of IFN- γ (59). Mechanistically, CXCL9 and CXCL10 bind to CXCR3, a receptor primarily expressed on T cells and NK cells (60) also found in NPCs (61). Among other effects, CXCL10 treated neurons developed increased membrane permeability, which was followed by caspase-3 dependent apoptosis (62). In fact, ZIKV infection leads to extensive caspase-3 activation in different animal and *in vitro* models (19, 29, 63, 64). This correlation becomes

more apparent considering that IFN- α/β treatment leads to enhanced calcification of cultured human vascular smooth muscle cells (65), indicating that IFN- α promotes the generation of calcium deposits and supports the proposition that IFN- α acts directly on ZIKV-induced microcephaly calcifications, a frequently reported clinical finding. Thus, we suggest that in the CNS, induction of IFN- α by ZIKV infection acts to further up-regulate the local chemokine response and consequently, apoptosis. On the other hand, direct IFN-independent induction of CXCL10 has been documented for different RNA viruses (66–68). Interestingly, CXCL10 elicits apoptosis in fetal neurons, dependent on intracellular Ca(2+) increase and caspase-3 activation (69). Based on this, we propose a model in which these inflammatory mediators act synergistically contributing to most of the alterations observed in microcephaly cases. To our knowledge, we are the first to demonstrate a more detailed neuroinflammation profile from human cases of ZIKV-induced microcephaly. Collectively, our data corroborate other independent findings that implicate type-1 IFNs as a potential modulating factor in ZIKV-associated pregnancy complications.

DATA AVAILABILITY

RNA-Seq data are available at NCBI BioProject under accession number PRJNA551246. Data supporting this study can be found at **Supplementary Files**. A complete description of methods can be requested from the corresponding author, further information supporting this study can also be made available.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML and RC performed the sample processing, Luminex assays, and analysis. ML, EA, RA, PF, PC, and CA-S contributed to the sample classification and laboratory diagnosis. LM performed the SH-SY5Y cells infection experiments, FACS, qRT-PCR analysis, and Luminex assays. MD, LD'A, KC, and JW performed the hiNPCs infection experiments and RNA-Seq assay. AR performed the RNA-Seq and transcriptomics analysis.

REFERENCES

- Miranda-Filho D de B, Martelli CMT, Ximenes RA de A, Araújo TVB, Rocha MAW, Ramos RCF, et al. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *Am J Public Health*. (2016) 106:598–600. doi: 10.2105/AJPH.2016.303115
- Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, Fonseca EB da, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr*. (2017) 171:288–95. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.3982
- de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. (2016) 16:1356–63. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30318-8
- de Araújo TVB, Ximenes RA de A, Miranda-Filho D de B, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil:

PC performed the virus quantification assay. AL-A, MG, and RF performed the statistical analysis of cytokines and chemokines profile in human samples. EM, AL-A, RF, CD, AK, VN, and MB-N contributed to the data interpretation and discussion. RF conceived the study, supervised the study, and wrote the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

FUNDING

The research leading to these results received funding from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco/FACEPE, grant agreement nos. APQ-0055.2.11/16 and APQ-0044.2.11/16, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq grant agreement 439975/2016-6 under RF coordination and responsibility. UK Medical Research Council Grants MC_UU_12014/8 and MR/N017552/1 under AK's coordination. VN received grant support from the Stanley Medical Research Institute (07R-1712), National Institutes of Health (MH63480 and D43 TW009114) and Cura Zika—University of Pittsburgh. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Fiocruz Luminex Platform (Subunidade Luminex-RPT03C Rede de Plataformas PDTIS, FIOCRUZ/RJ) for the use of its Luminex facilities. We also thanks Dr. Akiko Iwasaki from Howard Hughes Medical Institute, Yale School of Medicine, for her generosity on cytokines multiplex assays.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01928/full#supplementary-material>

- final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. (2018) 18:328–36. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30727-2
- Faria NR, Azevedo RDS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*. (2016) 352:345–9. doi: 10.1126/science.1250366
 - Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. (2016) 16:653–60. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
 - Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljiak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *New Engl J Med*. (2016) 374:951–8. doi: 10.1056/NEJMoa1600651
 - Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivaniemi S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *New Engl J Med*. (2016) 374:2142–51. doi: 10.1056/NEJMoa1601824
 - Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *New Engl J Med*. (2016) 374:1552–63. doi: 10.1056/NEJMra1602113

10. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika virus in body fluids—final report. *New Engl J Med*. (2018) 379:1234–43. doi: 10.1056/NEJMoa1613108
11. Lazear HM, Stringer EM, de Silva AM. The emerging Zika virus epidemic in the Americas: research priorities. *JAMA*. (2016) 315:1945–6. doi: 10.1001/jama.2016.2899
12. Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, Gil LH, Marques ET. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet*. (2016) 387:1811–2. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30253-7
13. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo S-S, Lee S-A, et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*. (2016) 19:663–71. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.019
14. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. (2016) 19:672. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.017
15. Garcez PP, Lóiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. (2016) 352:816–8. doi: 10.7287/peerjpreprints.1817v3
16. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. (2016) 18:587–90. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016
17. Caçola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. (2016) 534:267–71. doi: 10.1038/nature18296
18. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe*. (2016) 19:720–30. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.010
19. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*. (2016) 165:1081–91. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008
20. Brown JA, Singh G, Acklin JA, Lee S, Duehr JE, Chokola AN, et al. Dengue Virus immunity increases Zika virus-induced damage during pregnancy. *Immunity*. (2019) 50:751–62.e5. doi: 10.1016/j.imm.2019.01.011
21. Devakumar D, Bamford A, Ferreira MU, Broad J, Rosch RE, Groce N, et al. Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Infect Dis*. (2018) 18:e1–3. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30398-5
22. Hazin AN, Poretti A, Di Cavalcanti Souza Cruz D, Tenorio M, van der Linden A, Pena LJ, et al. Computed tomographic findings in microcephaly associated with Zika Virus. *New Engl J Med*. (2016) 374:2193–5. doi: 10.1056/NEJMc1603617
23. Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. (2016) 205:269–73. doi: 10.1007/s00430-015-0445-7
24. Ornelas AMM, Pezzuto P, Silveira PP, Melo FO, Ferreira TA, Oliveira-Szejnfeld PS, et al. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. *Ann Neurol*. (2017) 81:152–6. doi: 10.1002/ana.24839
25. Naveca FG, Pontes GS, Chang AY, Silva GAVD, Nascimento VAD, Monteiro DCDS, et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Memorias do Inst Oswaldo Cruz*. (2018) 113:e170542. doi: 10.1590/0074-02760170542
26. Donald CL, Brennan B, Cumberworth SL, Rezefj VV, Clark JJ, Cordeiro MT, et al. Full genome sequence and sRNA interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. *PLoS Neglected Trop Dis*. (2016) 10:e0005048. doi: 10.1371/journal.pntd.0005048
27. Castro MAA, Filho JLR, Dalmolin RJS, Sinigaglia M, Moreira JCF, Mombach JCM, et al. ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context. *Bioinform*. (2009) 25:1468–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp246
28. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. (2008) 14:1232–9. doi: 10.3201/eid1408.080287
29. Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LAR, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep*. (2016) 6:39775. doi: 10.1038/srep39775
30. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. (2016) 19:120–6. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.017
31. Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, et al. Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell*. (2017) 20:397–406.e5. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.005
32. Hanners NW, Eitson JL, Usui N, Richardson RB, Wexler EM, Konopka G, et al. Western Zika virus in human fetal neural progenitors persists long term with partial cytopathic and limited immunogenic effects. *Cell Rep*. (2016) 15:2315–22. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.075
33. Hu B-Y, Weick JP, Yu J, Ma L-X, Zhang X-Q, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:4335–40. doi: 10.1073/pnas.0910012107
34. Shipley MM, Mangold CA, Separa ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp*. (2016) 2016:53193. doi: 10.3791/53193
35. Tripathi S, Balasubramanian VRMT, Brown JA, Mena I, Grant A, Bardina SV, et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog*. (2017) 13:e1006258. doi: 10.1371/journal.ppat.1006258
36. Foo S-S, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang L-C, Choi Y, et al. Asian Zika virus strains target CD14 blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol*. (2017) 2:1558–70. doi: 10.1038/s41564-017-0016-3
37. Esser-Nobis K, Aarberg LD, Roby JA, Fairgrieve MR, Green R, Gale M Jr. Comparative analysis of African and Asian lineage-derived Zika virus strains reveals differences in activation of and sensitivity to antiviral innate immunity. *J Virol*. (2019) 93:1–8. doi: 10.1128/JVI.00640-19
38. Zhang F, Wang H-I, Wang Q, Liu Z-Y, Yuan L, Huang X-Y, et al. American strain of Zika virus causes more severe microcephaly than an old Asian strain in neonatal mice. *EBioMedicine*. (2017) 25:95–105. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.10.019
39. Brahma R, Gurumayum S, Naorem LD, Muthaiyan M, Gopal J, Venkatesan A. Identification of hub genes and pathways in Zika virus infection using RNA-seq data: a network-based computational approach. *Viral Immunol*. (2018) 31:321–32. doi: 10.1089/vim.2017.0116
40. Singh PK, Khatri I, Jha A, Pretto CD, Spindler KR, Arumugaswami V, et al. Determination of system level alterations in host transcriptome due to Zika virus (ZIKV) infection in retinal pigment epithelium. *Sci Rep*. (2018) 8:11209. doi: 10.1038/s41598-018-29329-2
41. Zanini F, Pu S-Y, Bekerman E, Einav S, Quake SR. Single-cell transcriptional dynamics of flavivirus infection. *eLife*. (2018) 7:e32942. doi: 10.7554/eLife.32942
42. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus—reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol*. (2016) 14:707–15. doi: 10.1038/nrmicro.2016.125
43. Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, Davi HPE, Iglesias SD, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. (2016) 388:898–904. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30883-2
44. Goutières F, Aicardi J, Barth PG, Lebon P. Aicardi-Goutières syndrome: An update and results of interferon-alpha studies. *Ann Neurol*. (1998) 44:900–7. doi: 10.1002/ana.410440608
45. Cuadrado E, Jansen MH, Anink J, De Filippis I, Vescevi AL, Watts C, et al. Chronic exposure of astrocytes to interferon- α reveals molecular changes related to Aicardi-Goutières syndrome. *Brain : J Neurol*. (2013) 136:245–58. doi: 10.1093/brain/awt321
46. Akwa Y, Hassett DE, Eloranta ML, Sandberg K, Maslah E, Powell H, et al. Transgenic expression of IFN- α in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J Immunol*. (1998) 161:5016–26.
47. Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, Akwa Y, Powell HC, Lane T, et al. Structural and functional neuropathology in transgenic mice

- with CNS expression of IFN- α . *Brain Res.* (1999) 835:46–61. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01328-1
48. Crow YJ. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann New York Acad Sci.* (2011) 1238:91–8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06220.x
49. Yockey LJ, Varela L, Rakib T, Khoury-Hanold W, Fink SL, Stutz B, et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. *Cell.* (2016) 166:1247–56.e4. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.004
50. Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol.* (2018) 3:eaa01680. doi: 10.1126/sciimmunol.aao1680
51. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramanian V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe.* (2016) 19:882–90. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009
52. Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O'Neal JT, McDonald CE, Fedorova NB, et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. *PLoS Pathog.* (2017) 13:e1006164. doi: 10.1371/journal.ppat.1006164
53. Yuan L, Huang X-Y, Liu Z-Y, Zhang F, Zhu X-L, Yu J-Y, et al. A single mutation in the pE1 protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science.* (2017) 358:933–6. doi: 10.1126/science.aam7120
54. Chimelli L, Moura Pone S, Avvad-Portari E, Farias Meira Vasconcelos Z, Araújo Zin A, Prado Cunha D, et al. Persistence of Zika virus after birth: clinical, virological, neuroimaging, and neuropathological documentation in a 5-month infant with congenital Zika syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2018) 77:193–8. doi: 10.1093/jnen/nlx116
55. Brito CAA, Henriques-Souza A, Soares CRP, Castanha PMS, Machado LC, Pereira MR, et al. Persistent detection of Zika virus RNA from an infant with severe microcephaly—a case report. *BMC Infect Dis.* (2018) 18:388. doi: 10.1186/s12879-018-3313-4
56. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Sharp TM. Persistence of Zika virus in body fluids—final report. *New Engl J Med.* (2019) 380:198–9. doi: 10.1056/NEJMc1814416
57. Blank T, Detje CN, Spieß A, Hagemeyer N, Brendecke SM, Wolfart J, et al. Brain endothelial- and epithelial-specific interferon receptor chain 1 drives virus-induced sickness behavior and cognitive impairment. *Immunity.* (2016) 44:901–2. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.005
58. Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8⁺ effector T cells. *J Leukoc Biol.* (2002) 71:669–76. doi: 10.1189/jlb.71.4.669
59. van Heteren JT, Rozenberg F, Aronica E, Troost D, Lebon P, Kuijpers TW. Astrocytes produce interferon- α and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutières syndrome. *Glia.* (2008) 56:568–78. doi: 10.1002/glia.20639
60. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* (2011) 89:207–15. doi: 10.1038/ich.2010.158
61. Tran PB, Banisadr G, Ren D, Chenn A, Miller RJ. Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *J Comp Neurol.* (2007) 500:1007–33. doi: 10.1002/cne.21229
62. Sui Y, Potula R, Dhillon N, Pinson D, Li S, Nath A, et al. Neuronal apoptosis is mediated by CXCL10 overexpression in simian human immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol.* (2004) 164:1557–66. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63714-5
63. Huang W-C, Abraham R, Shim B-S, Choe H, Page DT. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep.* (2016) 6:34793. doi: 10.1038/srep34793
64. Retallack H, Di Lullo E, Arias C, Knopp KA, Laurie MT, Sandoval-Espinosa C, et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 113:14408–13. doi: 10.1073/pnas.1618029113
65. Klok MD, Bakels HS, Postma NL, van Spaendonck RML, van der Knaap MS, Bugiani M. Interferon- α and the calcifying microangiopathy in Aicardi-Goutières syndrome. *Ann Clin Transl Neurol.* (2015) 2:774–9. doi: 10.1002/acn3.213
66. Asensio VC, Maier J, Milner R, Boztag K, Kincaid C, Moulard M, et al. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *J Virol.* (2001) 75:7067–77. doi: 10.1128/JVI.75.15.7067-7077.2001
67. Brownell J, Brackner J, Wagoner J, Thomas E, Loo Y-M, Cale M, et al. Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF- κ B and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection. *J Virol.* (2014) 88:1582–90. doi: 10.1128/JVI.02007-13
68. Klein RS, Lin E, Zhang B, Luster AD, Tollett J, Samuel MA, et al. Neuronal CXCL10 directs CD8⁺ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J Virol.* (2005) 79:11457–66. doi: 10.1128/JVI.79.17.11457-11466.2005
69. Sui Y, Stehno-Bittel L, Li S, Loganathan R, Dhillon NK, Pinson D, et al. CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci.* (2006) 23:957–64. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04631.x

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.

Copyright © 2019 Lima, Mendonça, Rezendé, Carrera, Anibal-Silva, Demers, D'Aiuto, Wood, Chowdhari, Griffiths, Lucena-Araujo, Barral-Netto, Azevedo, Alves, Farias, Marques, Castanha, Donald, Kohl, Nimpaonkar and Franca. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.