



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Estudo da Expressão de PPARs em Células de Microglia (BV-2) Infectadas pelas
Linhagens Asiática e Africana do Vírus Zika**

Vanessa Paola Alves Sampaio de Sá Freire

Dissertação de Mestrado

BRASÍLIA - DF

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Estudo da Expressão de PPARs em Células de Microglia (BV-2) Infectadas pelas
Linhagens Asiática e Africana do Vírus Zika**

Vanessa Paola Alves Sampaio de Sá Freire

Dissertação de Mestrado
apresentada como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título de
mestre em Patologia Molecular do
programa de pós-graduação da Faculdade
de Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília (UnB).

Orientador: Enrique Roberto Argañaraz.

BRASÍLIA - DF

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AV252e Alves Sampaio de Sá Freire, Vanessa Paola
 Estudo da Expressão de PPARs em Células de Microglia (BV
2) Infectadas pelas Linhagens Asiática e Africana do Vírus
Zika / Vanessa Paola Alves Sampaio de Sá Freire;
orientador Enrique Roberto Argañaraz. -- Brasília, 2019.
 98 p.

 Tese (Doutorado - Mestrado em Patologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2019.

 1. Vírus Zika. 2. PPAR . 3. microglia. 4. resposta imune.
5. neuroinflamação. I. Argañaraz, Enrique Roberto , orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às agências de fomento CAPES, FAP e CNPQ, ao coordenador do Programa, Sebastián Olivier Charneau, e todos os integrantes da pós-graduação da Patologia Molecular, e à instituição Universidade de Brasília por tornarem esta pesquisa possível.

Ao meu orientador, pela confiança, oportunidade e apoio, e por sempre proporcionar todos os meios para que eu realizasse este trabalho, e a todos os membros da banca, por gentilmente cederem seu tempo e conhecimento participando da avaliação deste trabalho.

Ao professor Francisco Neves, do Laboratório de Farmacologia Molecular, e à Mariella Lacerda pelo suporte prestado e pelos materiais cedidos para este trabalho. Aos professores Luciana Barros de Arruda e Marcelo Torres Bozza e seus alunos, em especial Lana, Sharton e Yasmin, por abrirem as portas de seus laboratórios da URFJ e pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Virologia Molecular, pelo companheirismo e ajuda em todo esse percurso, tornando os dias sempre mais doces, proveitosos e divertidos. Um agradecimento especial para Fernanda, minha dupla nesses quase 4 anos de UnB, que foi fundamental para este trabalho.

Aos meus pais, avós, irmãos, marido, filha canina e toda a família, pelo apoio incondicional, amor, união, paciência, companheirismo e por terem participado, cada um à sua maneira, de todas as etapas da minha vida. Dedico mais essa conquista a vocês!

Às minhas amigas da escola, grandes companheiras de aventuras, que estão há 15 anos ao meu lado, sempre me apoiando e acompanhando todas as etapas da minha vida

RESUMO

Nos últimos anos, o surgimento, ou ressurgimento, de diferentes arboviroses gerou um alerta global. Diferente da infecção causada por outros flavivírus, a infecção pelo ZIKV pode ocasionar alterações neurológicas, tais como malformações cerebrais em crianças de mães infectadas durante a gravidez, conhecidas como síndrome congênita do Zika (SCZ). Também foram relatadas outras alterações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. A microcefalia é uma desordem de células progenitoras neurais (CPN) desencadeada pelo isolado brasileiro (ZIKV_{PE243}), a qual pode atravessar a placenta e induzir neuroinflamação e ativação microglial. O isolado africano (ZIKV_{MR766}) também mostrou ser capaz de infectar células-tronco humanas pluripotentes *in vitro* e induzir a morte celular por apoptose, entretanto, não foram relatados casos de CSZ associados a esta linhagem. Estes dados, junto com as poucas informações disponíveis a respeito dos mecanismos neuroinflamatórios desencadeados por infecções virais, nos levaram a avaliar a possível relevância fisiológica dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) na resposta inflamatória após infecção de células da microglia-BV2 com as linhagens africana e asiática do vírus Zika. Em um primeiro momento foi possível observar que os isolados ZIKV_{MR766} e ZIKV_{PE243} são capazes de infectar células da microglia da linhagem BV2 e produzir partículas virais infecciosas, embora em níveis menores que os descritos para outros tipos celulares e não induzir efeitos citopatogênicos. Por outro lado, ambas os isolados induziram a expressão dos marcadores de ativação Iba1, CD68, enquanto a expressão do MHC-II foi induzida apenas pelo ZIKV_{MR766}. A infecção pelo ZIKV mostrou induzir a expressão de PPAR γ nas células BV2, sendo claramente superiores em células infectadas pelo isolado brasileiro, no entanto as células não apresentaram expressão de PPAR α . De modo geral, as células infectadas pelo isolado africano apresentaram maiores níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . O tratamento com Rosiglitazona evidenciou a participação do PPAR γ na modulação destas citocinas. Os níveis de expressão dos miRNAs 146a e 124 se correlacionam de forma geral com os níveis de expressão de PPAR γ , e com os das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, além de se correlacionar com seu alvo, a proteína TRAF6, um importante mediador inflamatório. Esperamos que as diferenças observadas entre as duas linhagens do ZIKV nos auxiliem, numa etapa posterior, a esclarecer os mecanismos moleculares envolvidas na doença ou proteção, virulência, tropismo tecidual, patologia, e evasão imune.

Palavras-chave: vírus Zika, PPAR, microRNA, microglia, resposta imune, neuroinflamação.

ABSTRACT

Recently, the emergence or resurgence of different arboviruses has generated a global alert. Unlike infection caused by other flaviviruses, ZIKV infection can cause neurological alterations, such as brain malformations in children of mothers infected during pregnancy, related to as Congenital Zika Syndrome (SCZ). Other neurological changes, such as Guillain-Barré syndrome, have also been reported. Microcephaly is a neural progenitor (NSC) disorder triggered by the Brazilian isolate (ZIKV_{PE243}), which can cross the placenta and induce neuroinfection and microglial injury. The African isolate (ZIKV_{MR766}) was also shown to be capable of infecting pluripotent human stem cells in vitro, inducing apoptotic cell death, however, this strain is not related to the associated CSZ cases. These data, together with limited information available regarding the neuroinflammatory mechanisms triggered by viral infections, lead us to assess a possible physiological relevance of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), in the inflammatory response following microglia-BV2 cell infection by both isolates, African and Brazilian. At first glance, it was possible to observe that ZIKV_{MR766} and ZIKV_{PE243} are capable of infect BV2 lineage cells and produce infectious viral particles, besides the fact that they do not induce cytopathic effects, and that the viral production occurs at lower levels compared to other cell lineages described. On the other hand, both isolates triggered the expression of the activation markers Iba1, CD68, while MHC-II expression were induced only by ZIKV_{MR766}. ZIKV infection induced PPAR γ expression in BV2 cells, being clearly higher in cells infected by the Brazilian isolate, however PPAR α was not expressed. Overall, cells infected by the African isolate showed higher levels of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . Furthermore, Rosiglitazone treatment evidenced PPAR γ participation in the modulation of these cytokines. The expression levels of miRNAs 146a and 124 correlates broadly with the expression levels of PPAR γ , and with those of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Those miRNAs levels are also correlated with their target protein, TRAF6, an important inflammatory mediator. We hope that the differences observed between the two ZIKV isolates help us, at a later stage, to clarify the molecular mechanisms involved in disease or protection, virulence, tissue tropism, pathology, and immune evasion.

Key-words: Zika Virus, PPAR, microRNA, microglia, immune response, neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Surto de Zika vírus, janeiro 2016.....	17
Figura 2.	Análise filogenética do genoma completo do ZIKV.....	19
Figura 3.	Estrutura do vírion e composição do genoma viral do ZIKV.....	21
Figura 4.	Clivagem de prM durante a maturação do vírus.....	23
Figura 5.	Adesão do ZIKV ao hospedeiro e o papel dos receptores TAM	25
Figura 6.	Ciclo de vida dos flavivírus	26
Figura 7.	Importância da modulação de peroxissomos para a replicação viral	28
Figura 8.	Resposta imune inata conta o ZIKV.....	32
Figura 9.	Duas proteínas do ZIKV, NS4A e NS4B, inibem a sinalização de Akt-mTOR.....	40
Figura 10.	Marcadores de ativação microglial decorrente de lesão cerebral	45
Figura 11.	Modelo de estrutura do receptor nuclear	47
Figura 12.	Mecanismo de ação do PPAR	48
Figura 13.	Titulação do ZIKV por ensaio de placa de lise (PFU)	60
Figura 14.	Viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de XTT	61
Figura 15.	Cinética de avaliação da replicação viral do ZIKV em BV2.....	62
Figura 16.	Avaliação da ativação das células BV2 induzida por ZIKV.....	65
Figura 17.	Alteração da expressão de PPAR γ em células BV2 pela infecção do ZIKV.....	68
Figura 18.	Alteração da expressão de citocinas em células BV2 após infecção pelo ZIKV	69

Figura 19.	Alteração da expressão de citocinas em células BV2 após a infecção pelo ZIKV, seguida de tratamento com Rosiglitazona	73
Figura 20.	Alteração da expressão do miR-124 em células BV2 após a infecção pelo ZIKV	74
Figura 21.	Alteração da expressão do miR-146a em células BV2 após a infecção pelo ZIKV.....	75
Figura 22.	Alteração da expressão de TRAF6, alvos dos miRNAs 124 e 146a, em células BV2 após a infecção pelo ZIKV	76
Figura 23.	Esquema geral da modulação de vias pelo Vírus Zika	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Sequência de iniciadores e sonda utilizados para ensaio de PCR em tempo real.....	59
------------------	---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
sNS1	NS1 secretada
MDA-5	Proteína associada à diferenciação do melanoma 5
AF	Função de Ativação
AP	Proteína Ativadora
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
BMECs	Células Endoteliais da Microvasculatura Cerebral
C	Capsídeo
CD	Célula Dendrítica
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças
CHIKV	Chikungunya vírus
CSF	Fluido Cérebro-espinhal
CX3CL	Ligante da Quimiocina CX3C
DAMPs	Padrões Moleculares Associados à Danos
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Vírus da Dengue
DSS	Síndrome do Choque da Dengue
E	Envelope

EBOV	Ebola Vírus
ER	Retículo Endoplasmático
EUA	Estados Unidos da América
Gas6	<i>Growth-arrest-specific 6</i>
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
gp-23	Glicoproteína de 23-kilodaltons
gp46	Glicoproteína de 46-kilodaltons
HLA	Antígeno leucocitário Humano
Iba1	Molécula Adaptadora de Ligação ao Cálcio Ionizado 1
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de IFN
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
IRAK1	Quinase 1 Associada ao receptor de IL-1
IRF	Fator Regulador de IFN
ISGs	Genes estimulados por IFN
ISREs	Elementos de Resposta Estimulados por IFN
JAKs	Janus quinases
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
JNK	Quinase c-Jun-N-terminal
Kb	Kilobases
LBD	Domínio de Ligação ao Ligante
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT-CD8 ⁺	Linfócito T com Cluster de Diferenciação 8 presente
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
miR/miRNA	microRNA
mNS1	Homodímero de NS1 associado à membrana

mRNA	RNA mensageiro
mTOR	via da rapamicina em mamíferos
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
nAbs	Anticorpos Neutralizantes
NCOA	Coativador-4 de Receptor Nuclear
NF-κB	Fator Nuclear κB
NFAT	Fator Nuclear de Linfócitos T
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NK	Célula Natural Killer
NLRs	Receptores Semelhantes à NOD
NO	Óxido Nítrico
NPCs	Células Progenitoras Neurais
NS	Proteína Não Estrutural
NSC	Célula Progenitora Neural
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase de Leitura Aberta
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PC	Fosfatidilcolina
pCDs	Células Dendríticas Plasmocitóides
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PEX	Peroxina
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais
PPRE	Elemento Responsivo de PPAR
prM	pré-membrana
ProS	Proteína S dependente de vitamina K
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
PSch	Células-tronco Humanas Pluripotentes
RIG1	Gene induzível pelo ácido retinóico 1
RLRs	Receptores Semelhantes à RIG

RXR	Receptor do ácido 9-cis-retinóico
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
SCZ	Síndrome Congênita do ZIKV
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Supressor da Sinalização por Citocinas
SOD	Superóxido Dismutase
ssRNA+	Fita simples de RNA de senso positivo
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
Sup	Sobrenadante
TZD	Tiazolinediona
TAM	Tyro3, AXL e Mer
TBK1	Quinase ligadora de TANK 1
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
TGN	Rede Trans-Golgi
Th	Linfócito TCD4 ou Linfócito T auxiliar
TIM	<i>T-cell Immunoglobulin and Mucin domain</i>
TLRs	Receptores Semelhantes à TOLL
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF	Fator Associado ao Receptor de TNF
TRIF	Molécula adaptadora indutora de IFN contendo o domínio TIR
UTR	Regiões Não Traduzidas
VLPs	Partículas Semelhantes a Vírus
WNV	Vírus do Nilo do Oeste
XRN1	Exoribonuclease 1
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika Vírus
ZIKV PE243	ZIKV isolado em Pernambuco do paciente número 243
ZIKVMR766	ZIKV isolado em Uganda do macaco número 766

LISTA DE SÍMBOLOS

Nº	Número
°C	Graus Celsius
kb	Quilobases
-/-	Nocaute
kDa	QuiloDaltons
~	Aproximadamente
nt	Nucleotídeos
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
>	Maior que
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
%	Porcento
pb	Pares de bases

Sumário

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. Introdução	16
1.1. O vírus da Zika	16
1.1.1. Epidemiologia: histórico da doença.....	16
1.1.2. Classificação filogenética	19
1.1.3. Estrutura e Genoma	21
1.1.4. Papel dos lipídeos na Infecção e Replicação viral.....	24
1.1.5. Resposta Imune.....	31
1.1.5.1. Resposta Imune Inata.....	31
1.1.5.1.1. Papel dos Peroxissomos na Resposta Imune Inata	35
1.1.5.2. Resposta Imune Adaptativa	35
1.1.6. Mecanismos de Evasão Viral.....	38
1.2. Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPARs)	47
1.2.1. PPARs, Peroxissomos e Flavivírus.....	52
2. Relevância da Pesquisa	53
3. Objetivos.....	54
3.1. Objetivos específicos.....	54
4. Materiais e Métodos	54
4.1. Cultura de células	54
4.2. Manutenção e propagação do vírus Zika	55
4.3. Titulação viral por ensaio de placa de lise (PFU).....	55
4.4. Infecção de BV2 com ZIKV	56
4.5. Ensaio de viabilidade celular utilizando o teste de XTT	56
4.6. Avaliação da replicação viral.....	57
4.7. Quantificação da expressão de PPAR γ e mediadores inflamatórios em BV2 infectadas, com e sem tratamento com Rosiglitazona	58
4.8. Análise Estatística.....	59
4.9. Análise qualitativa de CD68, Iba-1 e MHC-II por imunocitoquímica.....	59
5. Resultados e Discussão	61
5.1. Produção de Zika Vírus.....	61

5.2.	ZIKVPE243 e ZIKVMR766 não induzem citotoxicidade em células BV2.	61
5.3.	ZIKVPE243 e ZIKVMR766 não replicam de forma eficiente em BV2.....	63
5.4.	Ambos os isolados induzem a expressão de marcadores de ativação em BV2..	65
5.6.	O tratamento com Rosiglitazona reduziu os níveis de citocinas inflamatórias em células BV2 infectadas	73
5.7.	A infecção altera a expressão do miR-124 em células BV2.....	75
5.8.	A infecção altera a expressão do miR-146a em células BV2	76
5.9.	A infecção altera a expressão da proteína TRAF6 em células BV2	77
6.	Conclusões	79
7.	Próximos passos	81
8.	Perspectivas	81
9.	Referências Bibliográficas.....	82

1. Introdução

1.1. O vírus da Zika

1.1.1. Epidemiologia: histórico da doença

Nos últimos anos o surgimento de diferentes arboviroses gerou um alerta global de saúde, dentre elas o vírus Zika (ZIKV), que foi identificado pela primeira vez na Floresta Zika de Uganda durante uma intensa busca pelo vírus da febre amarela (YFV). Em 1947, o macaco Rhesus de número 766 foi capturado, apresentando temperatura de 39,7°C. No terceiro dia de febre, uma amostra de sangue foi coletada deste macaco e injetada por via intracerebral e intraperitoneal em camundongos Swiss, e por via subcutânea em outro macaco Rhesus (nº 771). Todos os camundongos inoculados intracerebralmente mostraram sinais de doença 10 dias após a inoculação, enquanto o macaco nº 766 não mostrou mais nenhuma anormalidade além da pirexia, e o macaco nº 771 não mostrou qualquer anormalidade nem temperatura corporal elevada. O agente isolado do macaco nº 766 foi referido como ZIKV_{MR766} (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O fato de vírus ter sido isolado de um macaco Rhesus sentinela e de um *pool* de mosquitos *Aedes (Ae.) africanus* indicou que o ZIKV era essencialmente uma infecção silvestre, sendo transmitida de um hospedeiro animal para outro (G. W. A. DICK, 1952). Por muito tempo os seres humanos foram considerados hospedeiros incidentais (WEINBREN; WILLIAMS, 1958), acreditando que as primeiras infecções humanas relatadas foram por Macnamara em 1954 em um surto de icterícia na Nigéria (MACNAMARA, 1954) e por Bearcroft que inoculou o vírus em um voluntário (BEARCROFT, 1956). Porém, dez anos depois, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) constatou que o vírus isolado por esses trabalhadores era próximo, se não idêntico, ao vírus Spondweni (CDC, 1985), e que o primeiro caso humano comprovado de infecção pelo ZIKV foi relatado por Simpson em 1964, de um pesquisador que ficou doente durante uma coleta de *Ae. africanus* na floresta Zika em 1962 (SIMPSON, 1964).

Assim, desde a sua descoberta até 2007, acreditava-se que o vírus Zika estava restrito a uma estreita região equatorial entre a África e a Ásia. Apenas quatorze casos esporádicos confirmados laboratorialmente foram relatados com quadro clínico clássico: exantema maculopapular pruriginoso, artralgia, conjuntivite, febre e, às vezes, cefaleia e mialgia. Até que, em 2007, o vírus se espalhou em uma grande epidemia na Ilha Yap nos Estados Federados da Micronésia, onde estima-se que 73% da população foi infectada (DUFFY et al., 2009). Deve-

se levar também em consideração a subnotificação desta doença, já que as manifestações clínicas são percebidas em somente cerca de 20% dos infectados (LANCIOTTI et al., 2008).

O que se sabia até então era que o ZIKV era um arbovírus pertencente ao gênero Flavivírus da família *Flaviviridae*, assim como o vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), entre outros (FAGBAMI, 1979), e que são encontrados na natureza mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos (HAYES, 2009). Até que entre outubro de 2013 e abril de 2014, uma nova epidemia atingiu a Polinésia Francesa, de onde vieram as primeiras indicações do envolvimento neural, descrevendo a síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos, além de outras complicações neurológicas (CAO-LORMEAU et al., 2016). A GBS é caracterizada por neuropatias periféricas mediadas por mecanismos imunológicos que se manifestam geralmente com uma paralisia motora simétrica, com ou sem envolvimento sensorial e autonômico (OEHLER et al., 2014), já reportada como associada à outras arboviroses, como WNV (LEIS; STOKIC, 2012), JEV (RAVI et al., 1994), DENV (MISRA et al., 2006) e Chikungunya vírus (CHIKV, *Togaviridae*) (LEBRUN et al., 2009). Além disso, o ZIKV também foi isolado do sêmen de um paciente (MUSSO et al., 2015), confirmando a transmissão não-vetorial, provavelmente sexual, observada em 2011, nos Estados Unidos da América (EUA) (FOY et al., 2011). No entanto, a maior preocupação foi com o aumento da incidência de microcefalia entre os recém-nascidos no Brasil em 2015, e com a possível capacidade do ZIKV de ser transmitido por via transplacentária. A microcefalia é uma doença que envolve proliferação prejudicada e morte de células progenitoras corticais no cérebro, que pode levar a graus variados de retardo mental (CHEN, 2018). Em abril de 2016, foi constatada a presença do ZIKV no cérebro de fetos (MLAKAR et al., 2016) e no líquido cefalorraquidiano de adultos (CARTEAUX et al., 2016). O surgimento da microcefalia e de outras desordens neurológicas fez da neuropatia do ZIKV um foco de atenção mundial.

Estudos filogenéticos sugerem que o ZIKV pode ter chegado ao Brasil durante o Campeonato Mundial de Canoagem de Primavera no Rio de Janeiro, que contou com a participação de países do Pacífico em que o ZIKV estava circulando, como Polinésia Francesa e Nova Caledônia (BARONTI et al., 2014; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Em seguida, outros países da América relataram a transmissão do vírus sendo que, até final de 2016, setenta e seis países e territórios no mundo confirmaram transmissão vetorial, o que são mais de 1,5 milhão de casos suspeitos (Figura 1). Essa grande disseminação, combinada com as condições neurológicas associadas, resultaram na declaração de emergência de saúde pública

global pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em fevereiro de 2016 (WHO, 2017).

Na América Latina, os mosquitos do gênero *Aedes*, como o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, são amplamente distribuídos e muito numerosos (PETERSEN et al., 2016). O ZIKV tem como principal vetor o *Ae. Aegypti*, porém é apenas mais um vírus à lista de arbovírus transmitidos pelas espécies deste subgênero, as quais se adaptaram muito bem a ambientes urbanos (MARCONDES; XIMENES, 2015). O subgênero *Stegomyia* inclui 128 espécies, dentre elas *Ae. luteocephalus* (FAGBAMI, 1979), *Ae. vitattus* (DIAGNE et al., 2015), *Ae. furcifer* (HAYES, 2009), *Ae. hensilii* (LEDERMANN et al., 2014) e *Aedes apicoargenteus* (MCCRAE; KIRYA, 1982) já foram confirmados como vetores da transmissão do ZIKV. Além disso, o ZIKV também foi isolado de pools de várias outras espécies de mosquitos, como *Culex perfuscus*, *Mansonia uniformis*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles coustani* (MARCONDES; XIMENES, 2015).

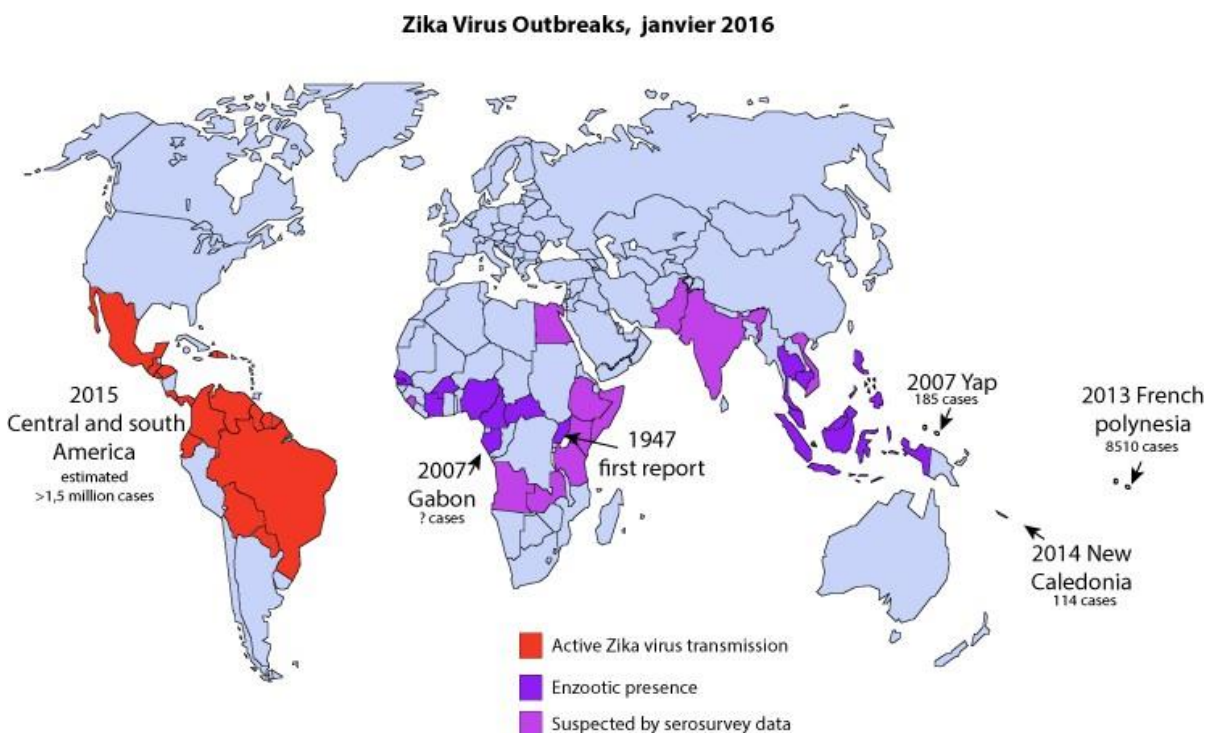


Figura 1. Surto de ZIKV, janeiro 2016. Países e territórios mostrando a linha histórica do tempo de propagação do vírus Zika (1947 - 2015). O vírus Zika não está necessariamente presente em todo o país/território sombreado neste mapa. Países em vermelho estão com transmissão ativa do ZIKV; em roxo, possuem presença enzoótica, infecção silvestre; e em rosa, têm suspeita por dados sorológicos. Modificado de SIB, 2016.

Nos últimos anos, esses mosquitos foram introduzidos em novas áreas, como nas Américas (*Ae. Aegypti* e *Ae. Albopictus*) (FAUCI; MORENS, 2016) e Europa (*Ae. albopictus*), sendo implicados como vetores de várias arboviroses (JULIANO; LOUNIBOS, 2005). O *Ae. aegypti* parece raramente invadir ambientes silvestres e tem sido implicado como vetor do CHIKV (MORENS; FAUCI, 2014), DENV e do vírus Mayaro em ambientes urbanos (VIEIRA et al., 2015). No Distrito Federal, apenas 6 casos de ZIKV foram confirmados por reação em cadeia de polimerase (PCR) entre 2017 e 2019 (SESDF, 2019).

1.1.2. Classificação filogenética

A análise filogenética da sequência parcial do ZIKV revelou que os isolados virais podem ser categorizados em duas cepas principais, africana e asiática, em que a linhagem africana é subdividida em duas linhagens: nigeriana e MR766 (FAYE et al., 2011). Estudos genéticos sobre o gene da proteína não estrutural 5 (NS5) indicam que o ZIKV foi provavelmente originário da África Oriental e se espalhou em direção à África Ocidental e Ásia há aproximadamente 50 a 100 anos (FAYE et al., 2014).

Em 2015, na cidade brasileira de Recife, um vírus foi isolado de um paciente com erupção na face e membros, artralgia das mãos, punho e tornozelo, edema nas mãos e punho, e sem sintomas neurológicos. Foi completamente sequenciado e descrito como ZIKV/*Homo sapiens*/Brasil/PE243/2015 (abreviado para ZIKV_{PE243}) (DONALD et al., 2016). Os dados das sequências obtidas da epidemia do Brasil confirmaram que são derivados da linhagem asiática e estão mais relacionadas aos isolados do surto da Polinésia Francesa em 2013, como mostrado na Figura 2 (MUSSO, 2015).

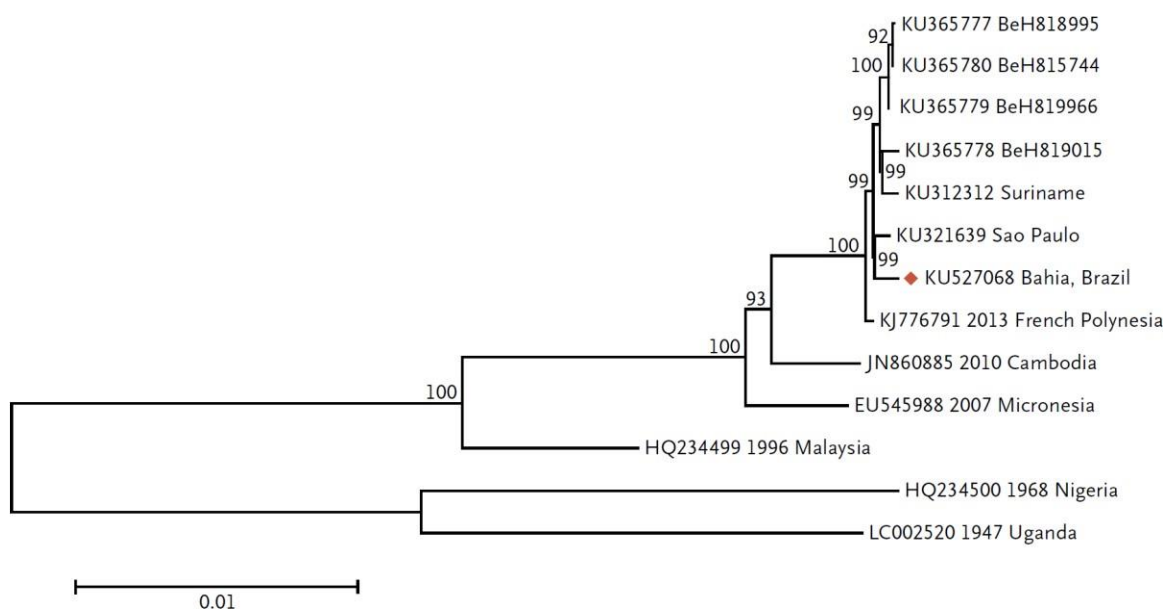


Figura 2. Análise filogenética do ZIKV. O número de acesso do GenBank, ano de isolamento e país de origem são indicados nas filiais do ZIKV para todas as cepas, exceto para as identificadas em 2015 e 2016. A barra de escala 0,01 indica a distância genética nas substituições de nucleotídeos por sítio. Na poliproteína do ZIKV Bahia, Brasil, 23 polimorfismos foram detectados em comparação com a linhagem da Micronésia e 5 polimorfismos em comparação com o isolado da Polinésia Francesa. **Adaptado de Mlakar et al., 2016.**

Alterações genéticas entre as linhagens do ZIKV são atribuídas à disseminação global de novos fenótipos e ao surgimento de neuropatogenicidade aumentada. A análise filogenética e variante de aminoácidos das linhagens espacialmente diferentes do ZIKV - MR766 (Uganda 1947), FSS13025 (Camboja 2010), P6-740 (Malásia 1966), PRVABC59 (Porto Rico 2015) e DAKAR 41519 (Senegal 1984) - revelaram distintas origens filogenéticas e diferenças significativas de aminoácidos na poliproteína viral. Níveis mais elevados de alterações acumuladas foram relatados na proteína do envelope, na região terminal da pré-membrana (prM), na NS2A e nas regiões da proteína NS5 dos genomas do ZIKV (TRIPATHI et al., 2017).

Entretanto, não há explicações virológicas óbvias baseadas na análise por sequenciamento, para o aumento da ocorrência de casos de doenças neurológicas associadas ao surto no Brasil. Além disso, não foram encontradas mutações específicas no genoma viral associadas a casos graves (FARIA et al., 2016), apesar das regiões não traduzidas (UTR) estarem amplamente ausentes em muitos sequenciamentos de isolados das Américas e dessa informação ser importante, dada a relevância dessas regiões genômicas não-codificadoras na tradução, replicação e patogênese do vírus. A região 5' UTR do ZIKV é amplamente conservada entre isolados de mesma linhagem, contendo aproximadamente 107 nucleotídeos (nt) em isolados da

linhagem asiática, semelhante ao comprimento da linhagem africana. Da mesma forma, existem poucas diferenças entre as região 3' UTRs conhecidas em isolados asiáticos e africanos. Donald e colaboradores encontraram forte similaridade entre os isolados ZIKV_{PE243} e Natal RGN, sendo esta última a sequência completa de um isolado brasileiro associado à microcefalia, enquanto a primeira é associada a sintomas clássicos (DONALD et al., 2016).

Apesar das grandes epidemias terem sido causadas pelo vírus da linhagem asiática, estudos sugerem que a linhagem africana é mais virulenta. Tripathi et al. observaram que as linhagens africanas do ZIKV induzem episódios curtos de sintomas neurológicos graves, seguidos de letalidade. Já as linhagens asiáticas, são capazes de provocar sinais prolongados de disfunções neuronais, ocasionalmente causando a morte de camundongos nocautes para STAT2. O ZIKV_{MR766} induz níveis mais altos de citocinas e marcadores inflamatórios associados à infiltração celular no cérebro de camundongos infectados, o que pode explicar a patogênese exacerbada em comparação à linhagem asiática (TRIPATHI et al., 2017).

1.1.3. Estrutura e Genoma

Semelhante a outros Flavivírus, o genoma do ZIKV é uma fita simples de RNA de senso positivo (ssRNA +) com aproximadamente 11 kb de comprimento, contendo uma única fase de leitura aberta (ORF), flanqueada por regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3'. A ORF codifica uma poliproteína que é clivada por proteases hospedeira e viral em capsídeo (C), precursor de membrana (prM), envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A NS4B e NS5), como ilustrado na Figura 3 (HEMERT; BERKHOUT, 2016). Muitas cópias da proteína C envolvem a fita simples de RNA formando o nucleocapsídeo, que é responsável pelo reconhecimento e montagem do RNA viral (FRANCOLINI et al., 2018). A proteína prM (gp23) tipicamente se associa com a proteína E, formando heterodímeros que são ancorados na bicamada lipídica derivada do hospedeiro através de seus domínios transmembrana, sendo importante para o dobramento apropriado do envelope (XUE et al., 2018). A glicoproteína do envelope é altamente conservada e composta por noventa dímeros dispostos em simetria icosaédrica que cobre completamente a superfície viral, a qual medeia a ligação, entrada e fusão às células hospedeiras dos mosquitos e dos mamíferos, sendo o alvo principal dos anticorpos neutralizantes (DAI et al., 2016). Além de controlar a tradução e replicação viral, as proteínas NS estão envolvidas na patogênese e na atenuação das respostas antivirais do hospedeiro (XUE et al., 2018).

A glicoproteína NS1 (gp46) forma um homodímero associado à membrana (mNS1), após translocação para o lúmen do RE, e é necessária durante a replicação do genoma viral e maturação do vírion (SHI; GAO, 2017). Células infectadas secretam NS1 (sNS1) no espaço extracelular como uma partícula de lipoproteína hexamérica (XU et al., 2016). A lipoproteína da sNS1 pode provocar não apenas anticorpos protetores, mas também anticorpos auto-reativos subneutralizantes, que contribuem para a síndrome do choque da dengue (DSS). Além disso, a sNS1 está envolvida na patogênese pela ativação de células da imunidade inata, pela interação com diferentes componentes do sistema do complemento e pelo envolvimento na evasão da resposta imune (YOUNG et al., 2000). A proteína NS1 de vários flavivírus demonstrou conferir proteção contra a infecção em modelos animais na ausência de anticorpos neutralizantes detectáveis. No entanto, ainda não se sabe se a imunização com a proteína NS1 de ZIKV tem capacidade de proteção semelhante (EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014).

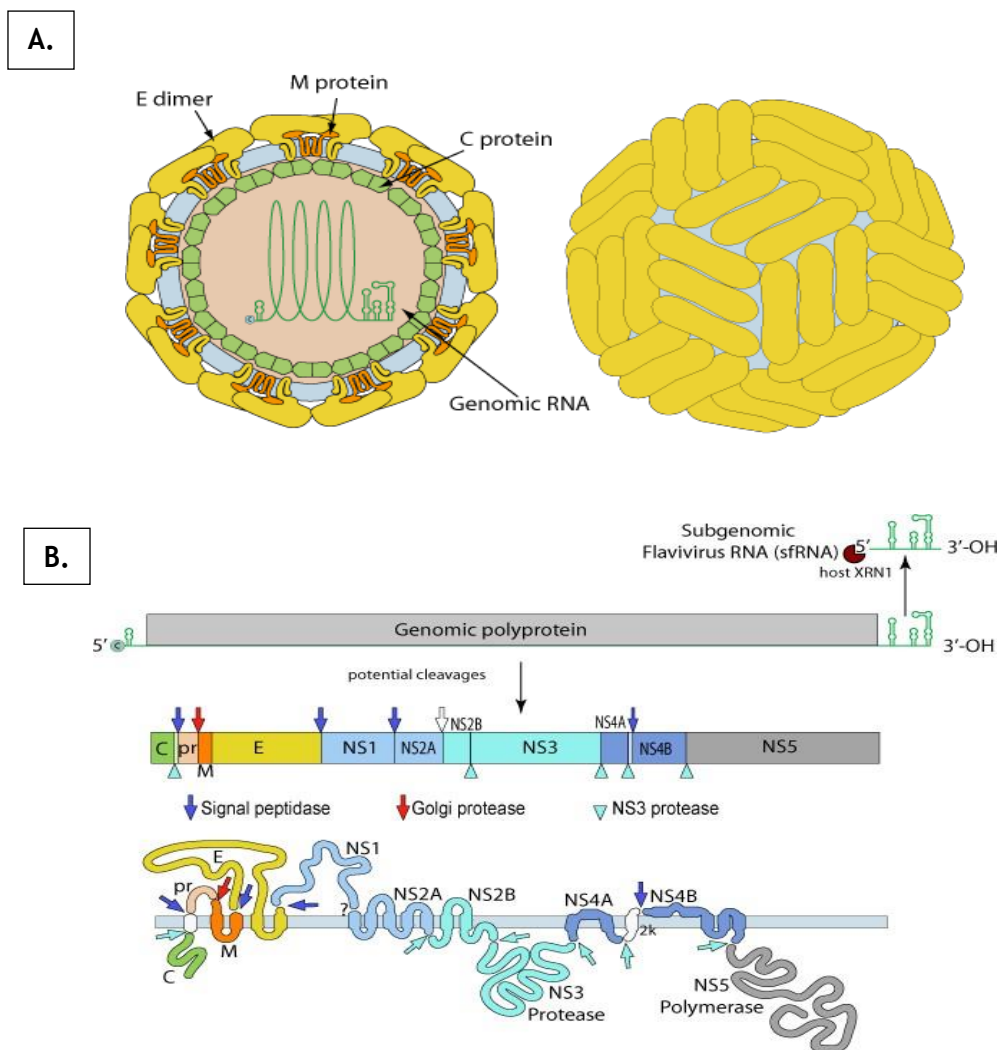


Figura 3. Estrutura do vírion e composição do genoma viral do ZIKV. **A.** Vírion: envelopado, esférico, com cerca de 50 nm de diâmetro. As proteínas de superfície estão dispostas em uma simetria semelhante à icosaédrica. **B.** Genoma: monopartite, linear, ssRNA+ de 10.794 bases. A extremidade 5' do genoma possui um *cap* de nucleotídeo metilado para tradução celular. O terminal 3' não é poliadenilado, mas forma uma estrutura em *loop*. Esta estrutura secundária leva à formação de um sfRNA através da degradação incompleta do RNA genômico pela XRN1 do hospedeiro. O sfRNA é essencial para a patogenicidade e pode desempenhar um papel importante na inibição da atividade antiviral do RIG-I do hospedeiro, um receptor de reconhecimento de padrão. O RNA do vírion é infeccioso e serve tanto como genoma quanto como RNA mensageiro viral. O genoma é traduzido em uma poliproteína de 3.419 aminoácidos de comprimento, que é processada *co* e *pós*-traducionalmente por proteases hospedeira e viral. **Adaptado de SIB, 2016.**

Por outro lado, as proteínas não estruturais NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas de membrana hidrofóbicas necessárias para a montagem do vírus e desempenham um papel importante na inibição da resposta do interferon (IFN). NS3 e NS5 possuem diferentes atividades enzimáticas: a proteína NS3 codifica a serina protease viral (ativa apenas com o cofator NS2B), helicase, nucleosídeo trifosfatase e RNA trifosfatase; a NS5 é a maior e mais conservada proteína viral, codifica uma metiltransferase no N-terminal, enquanto o C-terminal codifica o RNA polimerase dependente de RNA (CHAN et al., 2017; DUAN et al., 2017; LEI et al., 2016).

Um estudo demonstrou que uma única substituição de serina por asparagina (S139N) na proteína de membrana (prM) detectada em linhagens contemporâneas de ZIKV da linhagem asiática aumentou substancialmente a infectividade em células progenitoras neurais (NPCs) humanas e levou a maior neurovirulência em camundongos neonatais em relação a cepas ancestrais da mesma linhagem. Já a substituição reversa, N139S, do vírus parental diminuiu significativamente a mortalidade causada pelo vírus em fetos de camundongos (YUAN et al., 2017). A co-expressão de prM e E de vários flavivírus resulta na secreção de partículas semelhantes a vírus (VLPs) denominadas partículas subvirais recombinantes. A proteína prM sofre um evento de clivagem durante a maturação do vírus como na Figura 4. Portanto, as proteínas prM e E têm sido os principais alvos para o desenho racional de vacinas recombinantes (BOIGARD et al., 2017).

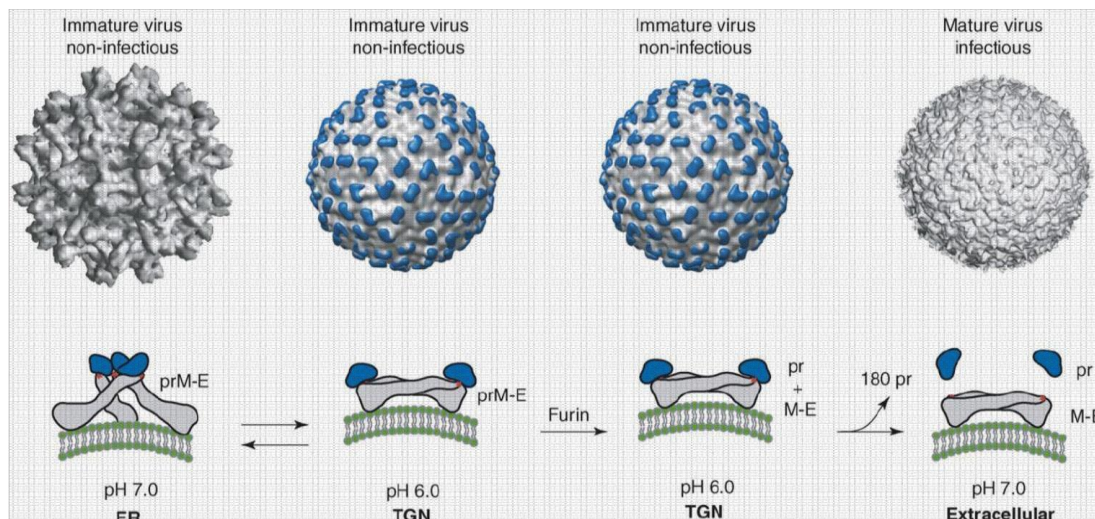


Figura 4. Clivagem de prM durante a maturação do vírus. Vírions imaturos/não infecciosos são formados no retículo endoplasmático (ER), onde a proteína E se liga com o prM. Em condições de pH ácido, 3 heterodímeros prM-E dissociam-se e reorganizam-se para formar uma protrusão trimérica com as alças de fusão inserindo-se na membrana endossômica. Este movimento puxará as membranas do vírus. 60 heterodímeros prM-E triméricos entram na rede trans-Golgi (TGN). Durante a maturação do vírion, o peptídeo pr é clivado da proteína M intracelularmente por protease do tipo Furina. Quando o vírion é liberado no espaço extracelular em condição de pH neutro, o pr é dissociado. Nessa circunstância, as protrusões triméricas de prM-E são rearranjadas para formar 90 homodímeros de E, gerando a superfície lisa no vírion maduro/infeccioso. No entanto, este processo é sempre ineficiente, e o vírus geralmente contém prM sem cortes. A extensão da clivagem de prM necessária para a transição de partícula não infecciosa para infecciosa é desconhecida. A presença de prM influencia a interação de vírions e anticorpos. **Adaptado de Kuhn, 2015.**

Comparações entre as sequências e as estruturas da proteína E do ZIKV com outros flavivírus mostram que partes dessa proteína se assemelham aos neurovirulentos WNV e JEV, enquanto outras partes são semelhantes ao DENV. Observou-se que a partícula do vírus é estruturalmente estável mesmo quando incubada a 40°C, em contraste acentuado com o DENV, menos estável termicamente, o que se reflete na infectividade em diferentes temperaturas (KOSTYUCHENKO et al., 2016, 2013). A microscopia crioeletrônica mostra um vírus com uma superfície mais compacta. Esta estabilidade estrutural do vírus pode ajudá-lo a sobreviver nas difíceis condições do sêmen, saliva e urina, por exemplo (MANSUY et al., 2016; BRUGNARO et al., 2016; GOURINAT et al., 2015).

1.1.4. Papel dos lipídeos na Infecção e Replicação viral

Para iniciar seu ciclo infeccioso, a partícula de flavivírus deve se ligar à superfície de suas células-alvo através de receptores específicos (PERERA-LECOIN et al., 2013). A entrada viral acontece pela interação da glicoproteína E com receptores celulares, e os lipídios desempenham um papel-chave na entrada viral, bem como para sua replicação e montagem. O colesterol, a

fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina têm sido sugeridos como os principais lipídios que compõem o envelope dos flavivírus (MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ, 2016; MEERTENS et al., 2012; RICHARD et al., 2015), os quais são reconhecidos por fatores de adesão, como DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), TIM 1 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin domain*), Tyro3, Axl e Mer (TAM, receptores de tirosina quinase) (HAMEL et al., 2015). A entrada do ZIKV mediada por AXL requer os ligantes Gas6 (*Growth-arrest-specific 6*) / ProS (proteína S dependente de vitamina K), que reconhecem fosfatidilserina exposta na superfície do envelope viral e liga as partículas do vírus às células da glia, (Figura 5) (MEERTENS et al., 2017). Estudos sugeriram que o receptor de superfície celular AXL funciona como receptor primário para a entrada do ZIKV em células precursoras neurais (NSCs), células da glia radiais, astrócitos e microglia, por ser altamente expresso nessas células (NOWAKOWSKI et al., 2016; TABATA et al., 2016; SHERIDAN et al., 2017). Porém, Li e colaboradores demonstraram que a deleção do AXL não reduzia a replicação do ZIKV em cérebros de camundongos, indicando que o AXL não desempenharia um papel essencial na infecção pelo ZIKV em cérebros de camundongos (LI et al., 2017).

Embora a capacidade dos TIMs de mediar a entrada e a infecção do flavivírus tenha sido associada pela primeira vez à sua capacidade de ligação à fosfatidilserina, também foi relatado recentemente que a ligação da fosfatidiletanolamina no envelope viral pelos receptores TIM também contribui muito para a internalização dos flavivírus (RYABCHIKOVA; KOLESNIKOVA; LUCHKO, 1999). CD300a, outro receptor fosfolipídico que pertence à família CD300 de receptores ativadores/inibidores emparelhados, também pode promover a infecção de DENV, WNV e YFV pela ligação de fosfatidilserina ou fosfatidiletanolamina associada a vírion (MORRISON et al., 2006).

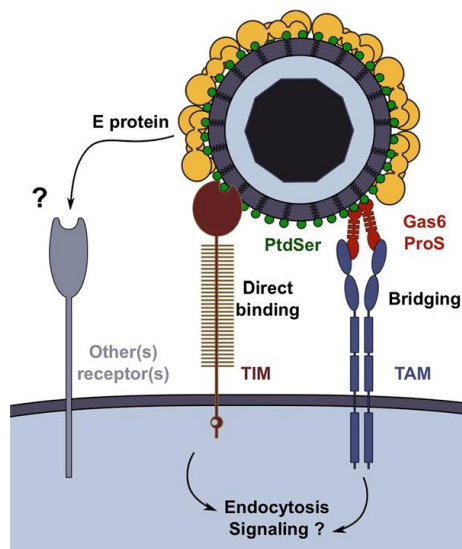


Figura 5. Adesão do ZIKV ao hospedeiro e o papel dos receptores TAM. Modelo proposto de reconhecimento direto de ZIKV pelos receptores TIM. Já as proteínas TAM se ligam indiretamente à fosfatidilserina viral através de seus ligantes naturais Gas6 e ProS, que agem como moléculas ponte. **Modificado de Meertens et al., 2012.**

A internalização dos flavivírus via receptores TIM e TAM pode estar relacionada ao mecanismo de depuração mediada por fosfatidilserina de corpos apoptóticos (PERERA-LECOIN et al., 2014; POON et al., 2014). Esta maquinaria baseia-se no reconhecimento de fosfatidilserina na superfície de célula apoptótica. Dessa forma, conforme descrito para outros vírus envelopados, os flavivírus poderiam tirar proveito deste mecanismo para internalização viral (AMARA; MERCER, 2015). É essencial considerar que a fosfatidilserina ou a fosfatidiletanolamina do envelope viral devem ser acessíveis para a interação com o receptor, permitindo a inserção e internalização dos vírus (Figura 5). No caso de DENV, a temperatura altera a arquitetura dos vírions. A 37 °C, as partículas se expandem e adotam uma conformação irregular, expondo as manchas do envelope (SLON CAMPOS et al., 2017), o que poderia facilitar sua entrada via receptores fosfolipídicos. Outro fator que poderia também facilitar a ligação de receptores fosfolipídicos é o grau de maturação da flavivírus, já que partículas imaturas e parcialmente maduras também exibem manchas expostas do envelope lipídico (PIERSON; DIAMOND, 2012).

Uma vez estabelecida a ligação ao receptor, a partícula viral é internalizada por meio de diferentes mecanismos, como mimetismo apoptótico através de endocitose mediada por clatrina, e tráfego por endossomos, para estabelecer uma infecção produtiva (MEERTENS et al., 2017; AMARA; MERCER, 2015; KALIA et al., 2013; VAN DER SCHAAR et al., 2008). Neste ponto, o RNA viral deve ser liberado da partícula viral para permitir sua tradução e replicação (Figura 6). Esta etapa ocorre através da fusão do envelope lipídico da partícula viral

com a membrana dos endossomos celulares. A fusão viral é desencadeada pelo pH ácido no interior dessas organelas, que inicia rearranjos conformacionais da glicoproteína E viral, resultando na exposição do peptídeo de fusão, que é inserido na membrana alvo celular, promovendo a fusão da membrana. No caso do ZIKV, a endocitose é mediada por clatrina, uma proteína que ajuda na biogênese e endereçamento de vesículas (PERERA-LECOIN et al., 2014). É importante ressaltar que a composição lipídica específica de ambos, envelope viral e membrana celular, parecem ser cruciais para o sucesso da fusão de membrana (PIERSON; KIELIAN, 2013; STIASNY et al., 2011).

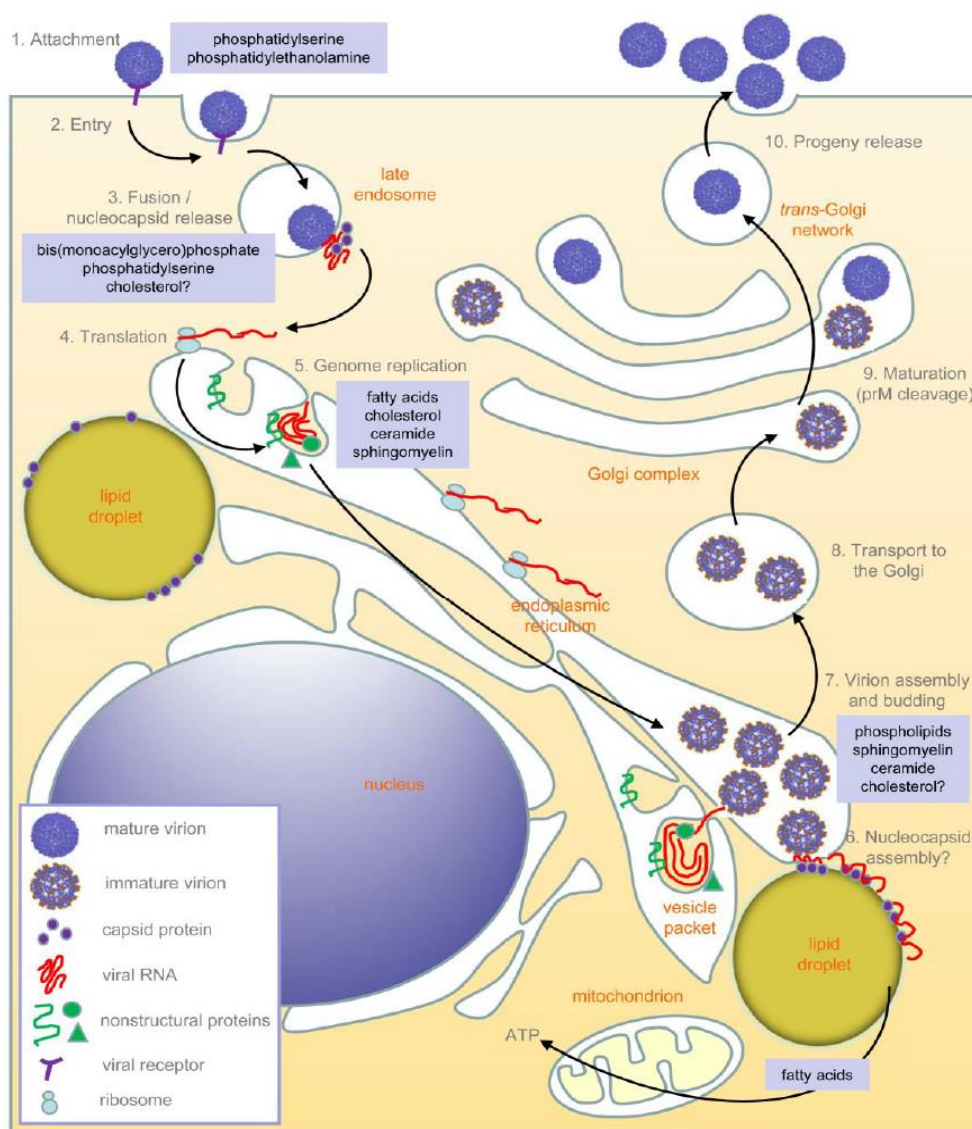


Figura 6. Ciclo de replicação dos flavivírus. Esquema representando a interação dos flavivírus desde a entrada da partícula viral que inicia a infecção até a saída de víriões através da via secretora. Observe a importância do ER e dos pacotes de vesículas derivados do ER, produzidas por invaginação da membrana do ER na replicação e montagem dos flavivírus. Os lipídios envolvidos em cada etapa estão em destaque, bem como a contribuição da gota lipídica para a infecção viral. **Adaptado de Martín-Acebes; Vásquez-Calvo; Saiz, 2016.**

Após a fusão da membrana, o RNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira, sendo traduzido em proteínas estruturais e NS, iniciando a replicação viral. Os flavivírus remodelam as membranas intracelulares, desenvolvendo estruturas semelhantes a organelas, com o intuito de criar plataformas adequadas para replicação viral (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; HARAK; LOHMANN, 2015; PAUL; BARTENSCHLAGER, 2015). Especificamente, a replicação de flavivírus produz rearranjos marcantes no retículo endoplasmático (ER) das células infectadas, caracterizado principalmente por invaginações de estruturas semelhantes a vesículas no lúmen dessa organela, denominadas pacotes de vesículas. Já foi mostrado que essas estruturas membranosas exibem lipídios específicos em sua composição, responsáveis pela topologia característica da membrana dessas estruturas, o qual é crucial para favorecer a replicação viral e a montagem do vírion. Da mesma forma, as conexões da replicação e montagem dos flavivírus com gotículas lipídicas celulares também foram propostas. As partículas imaturas de flavivírus recém-sintetizados são produzidas por brotamento da proteína C e do RNA genômico associado ao nucleocapsídeo em membranas derivadas do ER, que são “cravejadas” com prM e E. Desta forma, a membrana dos flavivírus sequestra porções modificadas do ER e, portanto, exibem uma composição lipídica única para alcançar suas funções. Essas partículas de flavivírus recém sintetizadas trafegam pela via secretória através do complexo de Golgi, e são submetidos à clivagem da proteína prM por um residente trans-Golgi do tipo furina protease, que promove a maturação das partículas antes de serem liberadas da célula infectada por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Tem sido dado destaque para o papel dos lipídeos na replicação dos vírus envelopados, por alterarem a geração e manutenção da curvatura da membrana celular, e conseqüentemente a entrada do vírus nas células hospedeiras por fusão das membranas virais com as membranas celulares (Figura 7) (MARTIN-ACEBES et al., 2014). Como a maioria dos vírus não possuem mecanismos apropriados para executar sua própria síntese lipídica, eles cooptam enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, orquestrando reajustes profundos no metabolismo lipídico da célula hospedeira com o intuito de adequar a função celular às suas próprias necessidades. Alterações na homeostase lipídica têm sido associadas a muitas infecções virais (JORDAN; RANDALL, 2016; MARTIN-ACEBES et al., 2014; MEERTENS et al., 2012; RICHARD et al., 2015). Queiroz e colaboradores mostraram níveis aumentados de várias espécies lipídicas de plasmalogênios no soro de pacientes infectados com ZIKV, a maioria delas eram

plasmalogênios ligados a ácidos graxos poliinsaturados. Porém, até o presente momento não existem evidências de que este aumento esteja ligado a distúrbios na membrana neural, nem de que ZIKV interaja com peroxissomos de células neurais (QUEIROZ et al., 2019). Como o ZIKV está envolvido na microcefalia neonatal e na síndrome de Guillain-Barré em adultos, podemos apenas especular que a infecção pelo ZIKV causaria alterações no sistema nervoso. No entanto, sabe-se que os plasmalogênios estão amplamente distribuídos pelo cérebro, coração, rim, músculo esquelético (BRAVERMAN; MOSER, 2012; MLAKAR et al., 2016).

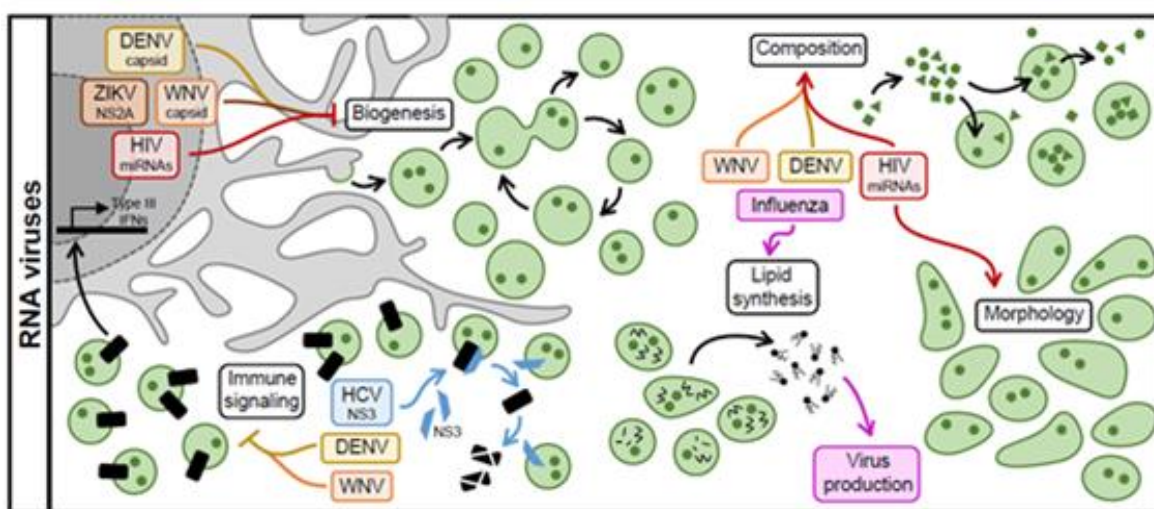


Figura 7. Importância dos peroxissomos para a replicação viral. Como os vírus envelopados não possuem mecanismos para executar sua própria síntese lipídica, precisam cooptar enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, orquestrando reajustes profundos no metabolismo lipídico da célula hospedeira. Através da inibição da biogênese de peroxissomos, os vírus envelopados são capazes de evadir à resposta imune inata, além de alterar a morfologia e o perfil lipídico celulares, afim de apoiar sua replicação. Abreviações: DENV, vírus da dengue; HCV, vírus da hepatite C; HIV, vírus da imunodeficiência humana; ROS, espécies reativas de oxigênio; WNV, West Nile vírus; ZIKV, Zika vírus. **Adaptado de COOK et al., 2019.**

Os plasmalogênios ligados aos ácidos graxos poliinsaturados representam até 20% do total de fosfolipídios em seres humanos, e são os principais constituintes das membranas neurais, participando de diversos processos mediados por lipídios, como fusão de membranas, transporte de íons, reservatório para segundos mensageiros, efluxo de colesterol e antioxidantes (FAROOQUI; HORROCKS, 2001). Especula-se que esses lipídios sejam particularmente importantes para a integridade e a fluidez da membrana, devido a seu envolvimento na neurodegeneração (DORNINGER; FORSS-PETTER; BERGER, 2017; SUN et al., 2018). Além disso, a biossíntese deste fosfolípido requer peroxissomos funcionais, que são locais importantes para replicação viral, incluindo o ZIKV. Assim, níveis aumentados de plasmalogênios no soro de indivíduos infectados com ZIKV sugerem uma ligação entre o ciclo

de replicação do ZIKV e os peroxissomos (QUEIROZ et al., 2019). Os lipídios sintetizados por peroxissomos são candidatos intrigantes para uma variedade de processos induzidos pela infecção, especialmente a formação de envelope viral, modulação do tráfego celular e manutenção da aptidão do hospedeiro e do vírus. De fato, as partículas infecciosas de vários vírus envelopados, incluindo HCMV, WNV, ZIKV e influenza, continham plasmalogênios, sugerindo que o metabolismo lipídico peroxissômico é uma característica geral das infecções por vírus envelopados (LIU et al., 2011; MARTIN-ACEBES et al., 2014; TANNER et al., 2014).

Além da síntese de ácidos graxos, o requisito para uma biogênese ativa de lipídios mais complexos, como o colesterol ou esfingolipídios, também foi documentado em células infectadas por flavivírus. A inibição de enzimas que catalisam diferentes reações-chave para a biossíntese de isoprenóides e colesterol reduz a multiplicação de flavivírus, apontando para a importância da biossíntese de colesterol na infecção por flavivírus (MACKENZIE; KHROMYKH; PARTON, 2007). Esse aumento de ácidos graxos também resulta em aumento da β -oxidação celular, que gera ATP para alimentar a replicação viral (HEATON; RANDALL, 2010). Além disso, foram reveladas várias associações entre os polipeptídeos específicos do ZIKV e as maquinarias de metabolismo lipídico das células hospedeiras, que são significativamente reprogramadas após a infecção pelo flavivírus (MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ, 2016). Um estudo de Wong e colaboradores realizado com astrócitos primários fetais humanos infectados pelas linhagens asiática e africana do ZIKV, mostrou uma redução de aproximadamente 70% no número de peroxissomos após 48 horas de infecção. Este estudo mostrou, ainda, que os genes relacionados com a biogênese peroxissomal envolvidos nessa modulação foram os fatores de biogênese da peroxina (PEX3, PEX7, PEX11b, PEX13 e PEX19) (WONG et al., 2019). Além disso, Coyaud e colaboradores já demonstraram que a proteína NS2A de ZIKV localiza-se em peroxissomos e interage com PEX19 e PEX3 para inibir a biogênese peroxissomal, enquanto outros trabalhos mostram que a proteína do capsídeo parece estar também envolvida na modulação dos peroxissomos (COYAUD et al., 2018; WONG et al., 2019).

1.1.5. Resposta Imune

Logo após a entrada do vírus, o hospedeiro desencadeia uma rede de defesa integrada, composta de fatores envolvidos nas respostas imune inata e adaptativa. Na área de inoculação, o vírus se replica em células dendríticas (CD) locais e nos macrófagos, os quais transportam o vírus para os linfonodos e outros tecidos linfoides para iniciar uma resposta imune adaptativa. Posteriormente nos tecidos linfoides, ocorre o recrutamento de monócitos que disseminam o vírus pela corrente sanguínea e o espalha para tecidos pelos quais tem tropismo. Durante este período de incubação silencioso, a carga viral na circulação aumenta rapidamente, atingindo níveis séricos elevados de partículas infecciosas (HAMEL et al., 2015).

1.1.5.1. Resposta Imune Inata

Estudos iniciais mostraram que as proteínas virais também podem funcionar como gatilho da resposta imune inata, porém, os ativadores mais predominantes são os ácidos nucleicos. Estes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são detectados por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes na superfície celular ou em compartimentos intracelulares. Entre eles incluem os receptores Toll-like (TLRs), os receptores semelhantes à RIG (RLRs), os receptores semelhantes a NOD (NLRs) e sensores de DNA citosólico (KAWAI; AKIRA, 2010; MEYLAN; TSCHOPP; KARIN, 2006).

Sabe-se que a resposta de IFN do hospedeiro é essencial para combater infecções virais e prevenir a replicação do vírus (CASTILLO RAMIREZ; URCUQUI-INCHIMA, 2015). A resposta imune inata contra os flavivírus é desencadeada pela detecção dos PAMPs através dos PRRs citosólicos RIG-I (gene induzível pelo ácido retinóico I) e MDA5 (proteína associada à diferenciação do melanoma 5), e endossômicos TLR 7/8 ou TLR3, que sinalizam a indução da produção de IFN- α/β (JOGI et al., 2015). Isso foi especificamente ilustrado para o ZIKV (LAZEAR et al., 2016). Enquanto o IFN tipo III mostrou ter um papel protetor contra a infecção por ZIKV em células placentárias humanas (BAYER et al., 2016; LAZEAR et al., 2016). Microglias, as principais células imunes do SNC, expressam o repertório completo dos TLRs. Evidências experimentais sugerem que TLRs distintos regulam a plasticidade neural e o desenvolvimento em neurônios. Por exemplo, o TLR3 inibe a proliferação de células progenitoras neurais no telencéfalo do rato embrionário e regula o crescimento axonal. Além disso, o TLR8 está envolvido na lesão e no desenvolvimento de neuritos associados ao desenvolvimento neural. Finalmente, TLR2 e TLR4 desempenham um papel na neurogênese adulta do hipocampo. O papel dos TLRs no desenvolvimento do cérebro e na morfogênese dos

vertebrados além dessas configurações específicas é praticamente desconhecido. Embora existam ligantes endógenos de TLRs, incluindo proteínas da matriz extracelular e proteínas de choque térmico, as moléculas derivadas do hospedeiro que estimulam os TLRs no contexto do desenvolvimento do SNC permanecem não identificadas. Uma maior expressão de TLR3 é observada em neurônios, astrócitos e micróglia, sugerindo uma função específica em resposta aos vírus encefalitogênicos no SNC (MATSUMOTO; OSHIUMI; SEYA, 2011; NAGYOSZI et al., 2010; ALEXOPOULOU; DESNUES; DEMARIA, 2012; KAWAI; AKIRA, 2011; POTH et al., 2010; THOMPSON et al., 2011; VINCENT et al., 2011).

Após o reconhecimento do PAMP, a transdução de sinal através destes receptores pode ser iniciada pelo recrutamento de MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88) e fosforilação de IRAK1 (quinase 1 associada a IL-1R), resultando na propagação da transcrição de genes dependentes do fator nuclear- κ B (NF- κ B), cujos produtos são necessários para iniciar uma resposta inflamatória (DUMBREPATIL et al., 2019). Outra possível via desencadeada pelo reconhecimento de PAMPs virais pelos TLRs é a que envolve a molécula adaptadora contendo o domínio TIR (TRIF - também conhecida como o domínio TIR contendo a molécula 1, TICAM1), que resulta na ativação do fator regulador de IFN 3 (IRF3), IRF7 e proteína ativadora 1 (AP-1) (THOMPSON et al., 2011). Essas vias culminam na transcrição de citocinas pró inflamatórias, IFN tipo I, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e genes relacionados com a resposta imune inata (Figura 8) (BARBALAT et al., 2011; BARTON; KAGAN, 2009; KAWAI; AKIRA, 2011). Os IFNs tipo I são citocinas que se ligam ao receptor de IFN (IFNAR) presente em quase todas as células, induzindo a via de sinalização Janus quinases (JAKs) e as vias de transdução de sinal e ativação da transcrição de proteína (STAT) 1 e STAT 2. Estas proteínas ativam a síntese de centenas de genes estimulados por IFN (ISGs), muitos dos quais conferem efeitos antivirais diretos, ao gerar um estado celular antagônico ao crescimento do vírus, enquanto outros facilitam e coordenam respostas imunes adaptativas (SCHOGGINS; RICE, 2011). Além disso, foi demonstrada a importância da resposta do IFN na modulação da infecção pelo ZIKV e no resultado da doença (BAYER et al., 2016; XIE; SHAN; SHI, 2016).

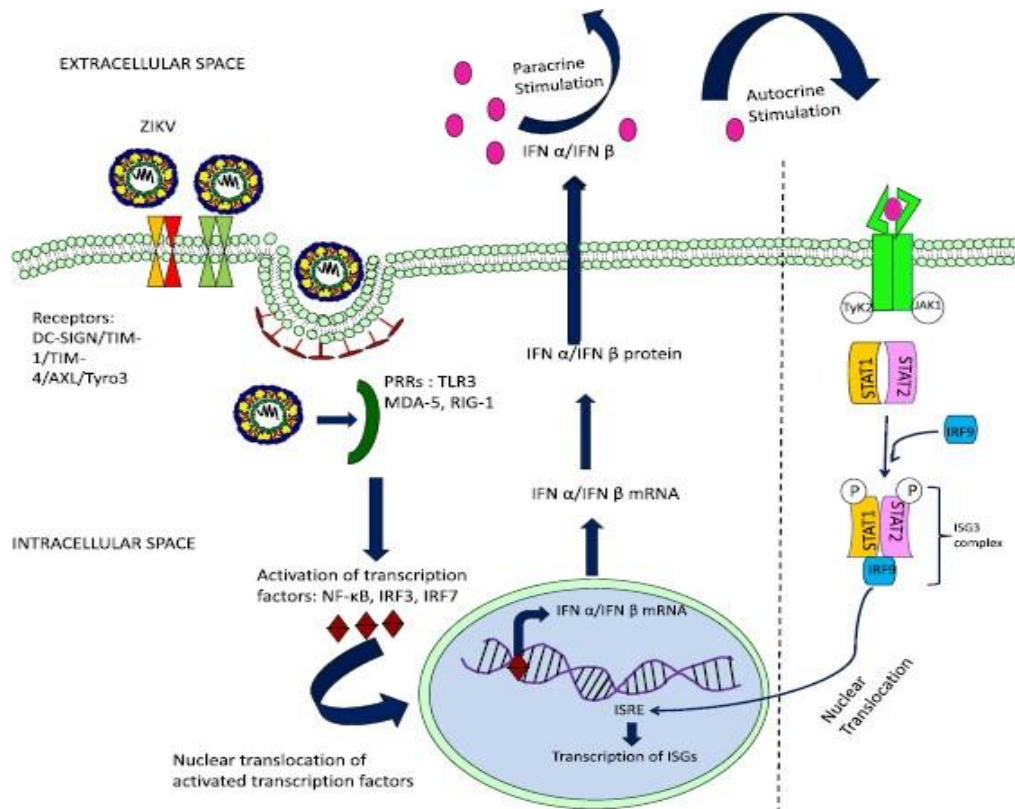


Figura 8. Resposta imune inata contra o ZIKV. O ZIKV entra nas células através da interação com receptores celulares como DC-SIGN/TIM-1/TIM-4/AXL/TYRO3, sendo endocitado através de mecanismos mediados por clatrina. Dentro da célula, o RNA viral é reconhecido por PRRs como TLR3/MDA-5/RIG-1. O reconhecimento viral estimula várias cinases, que, por sua vez, ativam os fatores de transcrição NF- κ B, IRF3 e IRF7. Os fatores de transcrição ativados são translocados para o núcleo, levando à transcrição dos genes de IFN-I e a subsequente secreção de IFN α e IFN β . Os IFNs podem estimular a mesma célula (autócrina) ou células vizinhas (parácrina). Os IFN-I se ligam aos receptores de IFN (IFNAR) celulares, ativando a sinalização JAK-STAT, que leva à formação do complexo de genes estimulados por interferon 3 (ISG-3), composto por dímeros de STAT-1, STAT-2 fosforilados e fator regulador do IFN 9 (IRF9). Este complexo se transloca para o núcleo e se liga aos elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE) no DNA, levando à transcrição de ISGs que restringem a infecção e propagação viral nas células, contribuindo com um estado antiviral. **Adaptado de Shaily; Upadhy, 2019.**

É importante salientar que a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) 11, que pertence à família serina/treonina quinase, sofre alterações durante a infecção pelo ZIKV. Esta quinase é ativada em resposta a uma ampla variedade de sinais, mediando as cascatas de transdução de sinal que regulam o crescimento, diferenciação, apoptose e imunidade inata, funcionando como um regulador positivo da via de sinalização JNK (HARTKAMP; TROPPEMAIR; RAPP, 1999). MAPK 11 pode fosforilar diretamente e ativar a I κ B quinase alfa e beta, além de estar envolvida na atividade transcrricional de NF- κ B (HEHNER et al., 2000). Recentemente, Xu e colaboradores demonstraram que esta quinase desempenha um papel crítico na defesa do hospedeiro contra o ZIKV, pois a super expressão de MAPK 11 suprime fortemente a infecção em vários tipos de células com deficiência desta quinase. Além disso,

URMC-099, um inibidor de MAPK, facilita diversas infecções virais, incluindo a causada pelo ZIKV. Foi observado que a infecção pelo ZIKV ativa MAPK 11, e que as proteínas E, NS1 e NS5 do ZIKV têm um papel importante nesse efeito. Desta forma, a cascata MAPK11/MKK7/JNK promoveria um aumento nos níveis de algumas citocinas e quimiocinas, como IL-6, IL-8, TNF- α e MCP-1. Essas citocinas inibiram a replicação do ZIKV de maneira dose-dependente, apresentando um efeito protetivo contra a infecção causada pelo ZIKV. Embora a infecção pelo ZIKV tenha sido associada à indução de mediadores pró-inflamatórios, a influência dessas citocinas e quimiocinas elevadas nos eventos virológicos do ZIKV ainda precisa ser esclarecida (O'CONNOR et al., 2018; ORNELAS et al., 2017; XU et al., 2019).

Além dos mecanismos descritos, os microRNAs (miRNAs, miRs), uma classe importante de pequenos RNAs (20-25 nt) de fita simples, não-codificantes, também desempenham papéis cruciais nas infecções virais, regulando o desenvolvimento, proliferação, diferenciação, apoptose e mecanismos de defesa do hospedeiro (BARTEL, 2009). Os miRNAs regulam a expressão gênica pós-transcricional através da ligação à sequências complementares, normalmente na região 3' UTR do mRNA alvo (GRIMSON et al., 2007). Dentre os diversos miRNAs já descritos, encontra-se o miR-146a, que é induzido pelo aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (WANG; CHEN; LONG, 2017), sendo capaz de suprimir a expressão dos mediadores inflamatórios mediada por NF- κ B, inibindo as proteínas IRAK1 e TRAF6, que são moléculas adaptadoras a jusante dos TLRs (TAGANOV et al., 2006; WEI et al., 2016). Li e colaboradores também demonstraram que este miRNA modula significativamente a expressão de TNF α , COX-2, iNOS, IL-6, IL-8 e RANTES nas células gliais humanas (Li et al., 2011). Além disso, já foi mostrado que a regulação negativa do miR-146 resulta no aumento da expressão do coativador-4 de receptor nuclear (NCOA4) que, por sua vez, é um conhecido ativador de PPAR γ (VILADOMIU et al., 2012). Um outro miRNA objeto de nosso estudo, e relacionado a PPAR γ , é o miR-124, o qual modula a produção de citocinas, tendo com o alvo a STAT3, o que leva à inibição da produção de IL-6 e da enzima conversora de TNF- α , reduzindo a liberação de TNF- α (SUN et al., 2013). Por outro lado, o miR-124 inibe diretamente uma subunidade de NF- κ B p65 e o fator 6 associado ao TNFR (TRAF6), inibindo o processo inflamatório (QIU et al., 2015). Dessa forma o miR-124 foi considerado um crítico mediador na regulação da resposta inflamatória. Curiosamente, a expressão do miR-124 é regulada positivamente pelo PPAR γ , o qual se liga diretamente ao PPRE na região promotora do miR-124. Dessa forma, a administração de agonistas de PPAR γ induz a expressão de miR-124 e inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios em camundongos (WANG et al., 2017).

1.1.5.1.1. Papel dos Peroxissomos na Resposta Imune Inata

Vários estudos recentes abordaram a biologia do peroxissoma na infecção e descobriram diversas interações vírus-hospedeiro que reativam o metabolismo, a estrutura e a biogênese do peroxissoma para apoiar a replicação e disseminação do vírus. A natureza plástica dessas organelas lhes permite responder a diversos processos biológicos, como durante infecções virais, remodelando sua biogênese, morfologia e composição para aprimorar funções específicas. Durante infecções por vírus, os peroxissomos atuam como importantes organelas de sinalização imunológica, ajudando o hospedeiro a orquestrar a sinalização antiviral. No entanto, os peroxissomos têm se mostrado ambíguo durante a infecção, por serem uma organela que pode ser seqüestrada para servir tanto ao vírus quanto ao hospedeiro (COOK et al., 2019).

O peroxissomo foi reconhecido pela primeira vez como um importante centro de sinalização subcelular após a descoberta de que a proteína adaptadora MAVS do receptor tipo RIG-I (RLR), um fator de sinalização da resposta imune inata, localiza-se no peroxissomo nas células humanas (DIXIT et al., 2010). O MAVS, anteriormente considerado exclusivo das mitocôndrias, é capaz de montar uma resposta antiviral rápida na detecção de genomas patogênicos mediada por RIG-I, controlando especificamente a resposta de interferon do tipo III quando ativada no peroxissomo. Combinada com as funções conhecidas de desintoxicação celular, a identificação dos MAVS peroxissômicos leva à idéia de que os peroxissomos atuam na defesa do hospedeiro durante a infecção como organelas de sinalização antiviral. Outros aspectos da plasticidade do peroxissomo, além da localização do MAVS, também são importantes na regulação da sinalização imunológica. Ao examinar a sinalização imune mediada por peroxissomo sob exposição a uma variedade de condições e patógenos celulares, Odendall e colaboradores mostraram que um aumento no número de peroxissomos é responsável pelo aumento da resposta por IFN-III. Isso sugeriu que a dinâmica do peroxissomo está intimamente ligada à magnitude da sinalização antiviral dependente de peroxissomo (ODENDALL et al., 2014).

1.1.5.2. Resposta Imune Adaptativa

A resposta imune adaptativa também é essencial para restringir a replicação do ZIKV. A ação das células T é, principalmente, dirigida contra peptídeos imunodominantes das proteínas E, prM, NS3 e NS5, os quais são altamente conservados entre as linhagens do vírus (ELONG NGONO et al., 2017). Contudo, as respostas humoral e celular não são igualmente importantes para a resistência à reinfeção. A indução de anticorpos anti-ZIKV é essencial para o controle

viral, já que a transferência adotiva do soro imune foi capaz de salvar camundongos da infecção letal intracerebral do ZIKV (NAZERAI et al., 2018). Por outro lado, em situações em que o indivíduo já apresentou infecções prévias por flavivírus, seus anticorpos circulantes podem se ligar ao vírus com alta avidéz e estarem presentes em altas concentrações, podendo restringir a infecção pelo ZIKV. Entretanto, se os anticorpos presentes forem de baixa afinidade e estiverem em concentrações subneutralizantes, eles podem contribuir para um aumento da viremia por um fenômeno chamado aumento de infectividade dependente de anticorpos, conhecido como “pecado antigênico original” (NGONO; SHRESTA, 2018; VATTI et al., 2017).

A contribuição dos linfócitos T, e particularmente das células LT-CD8⁺, na proteção e imunopatologia, por outro lado, tem sido mais debatido. Trabalhos com camundongos suprimidos de IFNAR sugerem um importante papel para estas células na infecção, enquanto estudos com camundongos adultos imunocompetentes sugerem que sua presença serve principalmente como um mecanismo de *backup*, quando os níveis de nAbs não são suficientemente elevados (ELONG NGONO et al., 2017; NAZERAI et al., 2018; WINKLER et al., 2017). Isto é apoiado por dados preliminares recentes que sugerem que, em camundongos com níveis apropriados de IFN tipo I, a atividade antiviral das células LT- CD8⁺ é precoce, desde que estejam presentes em grande número. Em um estudo com camundongos deficientes de IFN tipo I, as evidências indicam que as células LT-CD8⁺ específicas contra o vírus não só contribuem para o controle viral, mas também causam paralisia dos membros posteriores (JURADO et al., 2018). Por outro lado, as células LT- CD4⁺, dado o seu papel em respostas humorais adequadas, foram consideradas críticas para a proteção tanto em modelos de camundongos imunocompetentes, como de imunocomprometidos (HASSERT et al., 2018; LUCAS et al., 2018; NAZERAI; CHRISTENSEN; THOMSEN, 2019).

Durante as fases aguda e convalescente da infecção por ZIKV, níveis aumentados de citocinas relacionadas as respostas do tipo Th1, Th2, Th9, Th17 foram relatadas, sugerindo que é necessária uma resposta polifuncional das células T para a que o indivíduo se recupere da infecção (TAPPE et al., 2016). No entanto, uma imunoativação desequilibrada, com altos níveis de IL-6 e IL-8 no líquido cérebro-espinhal (CSF) tem sido associado à encefalomielite (GALLIEZ et al., 2016). Embora o principal papel seja desempenhado pela resposta humoral, foi recentemente sugerido que existe um envolvimento da resposta por células LT-CD8⁺ na proteção contra a infecção por ZIKV, em um modelo de camundongo (ELONG NGONO et al., 2017; SAPPARAPU et al., 2016). Além disso, a ativação de células T e sua polarização para Th1 também tem sido demonstrada em camundongos (PARDY et al., 2017). Pardy e

colaboradores demonstraram que a infecção por ZIKV induz uma ativação significativa de células LT- CD8⁺ e LT-CD4⁺. A frequência de células LT-CD8⁺ co-expressando CD38 e moléculas HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II) do complexo de histocompatibilidade maior (MHC-II) foi semelhante em pacientes com ZIKV e DENV, porém menor que durante a infecção por EBOV, sugerindo que uma ativação moderada pode estar associada a atividade protetora e um perfil leve da doença (AGRATI et al., 2016; MATHEW; ROTHMAN, 2008; MCELROY et al., 2015). Em infecções agudas, como as causadas pelos DENV ou EBOV, a ativação de células T está associada a uma expressão aumentada de marcadores apoptóticos, porém o papel da apoptose durante a infecção por ZIKV ainda não foi esclarecido (TORRENTES-CARVALHO et al., 2014; PARDY et al, 2017).

A capacidade dos linfócitos T de se diferenciarem em células efetoras também é uma característica chave de uma resposta protetora. Durante a infecção pelo ZIKV, foi descrita uma diferenciação das células LT-CD4⁺ em células de memória e efetoras, sugerindo a aquisição de perfis de citotoxicidade e de produção de citocinas (PARDY et al., 2017). O mesmo fenótipo efector de células T foi também descrito em um modelo de infecção por ZIKV em camundongos. No entanto, observou-se uma redução significativa de células LT-CD4⁺ produtoras de IFN- γ em relação aos pacientes com DENV, sendo possível especular que as células LT-CD4⁺ foram polarizadas durante a infecção pelo ZIKV para produzir citocinas e quimiocinas diferentes do IFN- γ . A capacidade do ZIKV de inibir a produção e a resposta do IFN-I foi relatada, mas a redução da produção de IFN- γ pelas células T representa uma nova descoberta, cujo papel no contexto de proteção/patogênese necessita de mais investigações (BOWEN et al., 2017; GRANT et al., 2016).

Além disso, Cimini e colaboradores demonstraram uma expansão substancial de células T $\gamma\delta$ 2 que expressam granzima B, durante a infecção pelo ZIKV, que foi mais pronunciada durante os primeiros dias do início dos sintomas (CIMINI et al., 2017). A importância do papel das células T $\gamma\delta$ 2 em uma resposta imune bem orquestrada contra à infecção viral está bem documentada (POCCIA et al., 2005). De fato, as células T $\gamma\delta$ humanas podem afetar a progressão e o resultado de doenças infecciosas (POCCIA et al., 2006; TU et al., 2011). Células T $\gamma\delta$ 2 ativadas são capazes de exercer atividades antivirais diretas e realizar várias atividades estimulatórias em ambas as células imunes, inatas e adaptativas (AGRATI et al., 2009; POCCIA et al., 2005; VANTOUROUT; HAYDAY,2013). Vários estudos sugerem um papel protetor durante infecções virais agudas, como em resposta à infecção pelo WNV, as células T $\gamma\delta$ expandem-se rapidamente e produzem uma quantidade significativa de IFN- γ , limitando a

carga viral e protegendo o hospedeiro da encefalite letal (WANG, 2011; WANG et al., 2006). Além disso, o perfil Th1 das células TV δ 2 pode contribuir para a lesão da placenta e/ou inflamação que é correlacionada com a lesão cerebral fetal durante a infecção pelo ZIKV (MOR, 2016). Finalmente, as células T $\gamma\delta$ também podem desempenhar um papel durante as doenças autoimunes e, em particular, durante a síndrome de Guillain Barré, contribuindo para os danos autoimunes (PAUL; SHILPI; LAL, 2014; VAN RHIJN et al., 2003; WINER et al., 2002).

1.1.6. Mecanismos de Evasão Viral

Em defesa a respostas antivirais do hospedeiro, os vírus reagem por diversos mecanismos. A evasão imunitária é mediada pelas proteínas não estruturais, que atuam coletivamente para limitar e escapar das respostas imunes através da interferência com vias de sinalização. Foi mostrado que as proteínas virais NS1, NS4B e NS2B inibem a indução de ISGs a jusante de IFN através de várias vias, incluindo a inibição da sinalização de IFN- β e JAK STAT (WU et al., 2017). Além disso, o ZIKV inibe a sinalização da via de IFN tipo I e RIG I em CDs, antagonizando a fosforilação de STAT1 e STAT2, além de bloquear as respostas mediadas por células NK, sistema complemento, linfócitos B e T (ASIF et al., 2017; BOWEN et al., 2017; JOST; ALTFELD, 2013; YE et al., 2013). Um estudo mostrou que a proteína NS5 de um isolado brasileiro recente do ZIKV foi capaz de bloquear a indução do IFN tipo I, além de inibir a sinalização do IFNAR (HERTZOG et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que a NS5 mediou a degradação proteassômica de STAT2 humana, inibindo a via de ativação mediada por IFN-I e favorecendo a via de ativação mediada por IFN-II, propiciando a formação de homodímeros de STAT-1 (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Outra pesquisa recente demonstrou que a NS5 da linhagem africana ZIKV_{MR766} antagonizou a produção de IFN através da inibição da ativação da quinase ligadora de TANK 1 (TBK1), que fosforila o IRF3, resultando em menos complexo de TBK1 e TRAF6, atenuando a ativação de TBK1 e a fosforilação de IRF3 (LIN et al., 2019).

Glasner e colaboradores observaram que a infecção pelo ZIKV é detectada por RIG I e IRF3, o que leva à secreção do IFN tipo I, resultando em um aumento da expressão do MHC-I. Já havia sido demonstrado que flavivírus são capazes de regular as moléculas do MHC-I durante a infecção, em parte induzindo a expressão de IFN- β em camundongos e humanos, e foi demonstrado que este processo é dirigido pela via do NF- κ B (KESSON; KING, 2002; KING;

KESSON, 1988; SHEN et al., 1997). A elevação da expressão de MHC classe I resulta em um aumento da lise por células T e inibição da morte por células NK (LIU et al., 1989). Propõe-se que o ZIKV explora a resposta de IFN, com objetivo de regular positivamente as proteínas do MHC classe I, inibindo a atividade das células NK. Esta hipótese é apoiada pela observação do aumento da secreção de IFN γ pelas células NK após a sua interação com células infectadas, o que provavelmente contribui com a capacidade das células alvo de regular as moléculas de MHC-I e escapar da morte direta pelas células NK. O fato de MHC-I estar super expresso, indica que os mecanismos de escape do vírus são direcionados principalmente contra as células NK. Especula-se que a ausência de mecanismos virais para inibir a atividade das células T seja devida à sua rápida cinética de replicação (GLASNER et al., 2017).

Por outro lado, os receptores TAM desempenham um papel dual durante a infecção por flavivírus. Na entrada, os receptores TAM capturam os complexos vírus-Gas6/ProS e melhoram a internalização de vírus através de mecanismos ainda desconhecidos. Paralelamente, esses complexos também ativam os receptores TAM, que recrutam o receptor de interferon (IFNAR) para induzir a expressão do supressor da sinalização de citocinas (SOCS) 1/3, inibindo assim as respostas antivirais inatas e facilitando a replicação (PERERA-LECOIN et al., 2014). Outros mecanismos de evasão têm como alvo os peroxissomos. Os vírus DENV e WNV direcionam as proteínas do capsídeo para membranas peroxissomais, onde eles interagem com o fator de biogênese Peroxina (PEX) 19, causando uma redução de quase 40% no número de peroxissomos e, conseqüentemente, inibindo a expressão de interferon do tipo III (YOU et al., 2015). O ZIKV, outro membro da família Flavivirus, altera os números de peroxissomo por meio de um mecanismo diferente: a proteína viral NS2A localiza-se em peroxissomos e interage com PEX19 e PEX3 para inibir a biogênese do peroxissomo. Embora isso não tenha sido totalmente associado à modulação imunológica, é provável que o ZIKV iniba a sinalização peroxissômica de maneira semelhante aos membros da família DENV e WNV. (COYAUD et al., 2018).

1.1.7. Patogênese do Zika

O processo inflamatório que ocorre após a disseminação do vírus para os tecidos causa o recrutamento de monócitos inflamatórios e células NK, em associação com o desenvolvimento de vários sintomas clínicos, incluindo dores de cabeça, nas costas e musculares, náuseas e vômito, erupção cutânea, artralgia e mialgia (PETITDEMANGE et al., 2014; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015; PINGEN et al., 2017; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). No entanto, apesar de certas semelhanças clínicas nas infecções por flavivírus, também existem diferenças nas manifestações mais graves das doenças, como a proeminente e prolongada artralgia causada pelo CHIKV, a febre hemorrágica pelo DENV e a microcefalia e outras manifestações neurológicas pelo ZIKV (GOULD; SOLOMON, 2008; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015; WIKAN; SMITH, 2016).

O ZIKV apresenta extenso tropismo celular e tecidual, sendo encontrado em vários fluidos corporais, como sangue, lágrimas, saliva, sêmen, secreções vaginais, urina, líquido cefalorraquidiano e líquido amniótico (MINER; DIAMOND, 2017; NGONO; SHRESTA, 2018). A presença do ZIKV afeta a função de muitos órgãos do hospedeiro mamífero, especialmente os órgãos e tecidos privilegiados, como cérebro, olhos, testículos e placenta. Estes órgãos suportam a infecção, amplificação do vírus e podem servir como reservatórios virais (KALKERI; MURTHY, 2017). Além disso, o ZIKV é capaz de atravessar a placenta e infectar o líquido amniótico e os tecidos cerebrais fetais, causando um impacto significativo no desenvolvimento cerebral (MAGNANI et al., 2018). Estudos recentes mostraram que a patogênese das infecções por ZIKV depende dos estágios do desenvolvimento cerebral. A infecção no início do período gestacional causa a morte fetal, enquanto a infecção no final do período gestacional está associada à redução significativa das NPCs, já que o ZIKV induz uma lesão substancial no cérebro fetal, ao inibir a proliferação de células-tronco neuronais e induzir a sua diferenciação prematura especialmente no córtex temporal, no giro dentado e no hipocampo (ADAMS WALDORF et al., 2018; COFFEY et al., 2018; LI et al., 2016a). Já a infecção pós-natal causa alterações estruturais e funcionais persistentes do sistema nervoso central, incluindo mudanças maturacionais em regiões específicas do cérebro (MAVIGNER et al., 2018).

Além disso, a infecção interrompe a homeostase metabólica celular, o que favorece a replicação viral nas células infectadas (ALLONSO et al., 2015; FONTAINE et al., 2015; TIWARI et al., 2017). O perfil global de expressão gênica de diferentes linhagens celulares infectadas, incluindo a micróglia, revelou diferenças significativas nos processos metabólicos

do hospedeiro (TIWARI et al., 2017). Foi demonstrado que a infecção pelo ZIKV induz a reprogramação do metabolismo da glicólise, a fim de apoiar a síntese de proteína e RNA virais (FRUMENCE et al., 2016). Na infecção de células da glia, foi observado um aumento da expressão de superóxido dismutase 2 (SOD2) mitocondrial, um gene anti-oxidante, em resposta ao estresse oxidativo elevado, além de modular o metabolismo celular nas células neuronais com base nos estágios de diferenciação. Por outro lado, as proteínas acessórias NS4A e NS4B do ZIKV, induzem a ativação do p53 e a inibição da via da rapamicina em mamíferos (mTOR) em células-tronco neuronais, levando à diferenciação prematura, apoptose e exaustão celular, colaborando com a inibição da neurogênese, com o aumento da replicação viral e com a patogênese neurológica associada (Figura 9) (ROTHAN et al., 2019; TRICARICO et al., 2017).

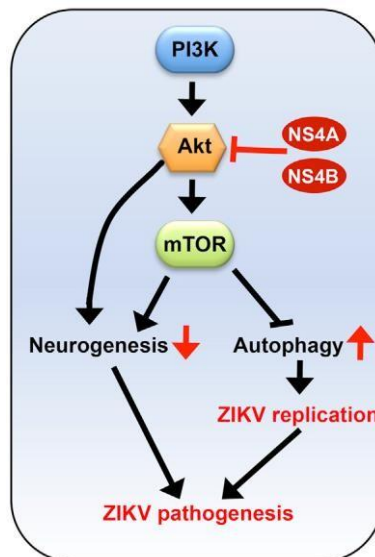


Figura 9. Duas proteínas do ZIKV, NS4A e NS4B, inibem a sinalização de Akt-mTOR, bloqueiam a neurogênese e promovem a autofagia. A sinalização de Akt-mTOR é uma das vias essenciais para o desenvolvimento do cérebro e para a regulação da autofagia, a qual também é um mecanismo ativo de proteção celular contra a infecção viral. A ativação de mTOR pela sinalização de Akt e MAPK suprime a autofagia, e a inativação de mTOR pela AMPK e sinalização de p53 promovem autofagia. Os vírus tentam, assim, modular a autofagia para beneficiar seus ciclos de vida e estabelecer infecção persistente. A infecção do ZIKV em células-tronco neurais fetais humanas causa inibição da via Akt-mTOR, levando à neurogênese defeituosa e à ativação aberrante da autofagia. **Adaptado de Liang et al., 2016.**

1.1.8. Vírus Zika e o Sistema Nervoso Central

O ZIKV foi detectado nos cérebros *post-mortem* de fetos microcefálicos ou natimortos e no CSF de adultos encefalíticos, indicando que o vírus invade de alguma forma o SNC (CARTEAUX et al., 2016; MLAKAR et al., 2016). De fato, numerosos estudos indicaram que o ZIKV é neurotrópico. RNA viral foi detectado no cérebro de camundongos inoculados por diferentes vias, também em organóides cerebrais infectados *in vitro*, e no CSF de macacos rhesus infectados (ALIOTA et al., 2016; CUGOLA et al., 2016; GARCEZ et al., 2016). A linhagem brasileira do ZIKV (ZIKV_{PE243}) pode infectar o feto, causando restrição no crescimento intrauterino, incluindo sinais de microcefalia em camundongos. Por outro lado, achados clínicos e epidemiológicos apontaram uma possível correlação entre a infecção pelo ZIKV e o aumento de casos de manifestações neurológicas semelhantes à GBS (CAO-LORMEAU, 2014; VAN DEN BERG et al., 2014). A linhagem africana (ZIKV_{MR766}) também foi capaz de infectar *in vitro* células-tronco humanas pluripotentes (PSCs) derivadas de NPCs, induzindo morte celular por apoptose (TANG et al., 2016).

A infecção pelo ZIKV foi associada à anormalidades cerebrais graves, como a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ), em recém-nascidos (CHIMELLI et al., 2017; DEL CAMPO et al., 2017; SCHULER-FACCINI et al., 2016). A SCZ se caracteriza por microcefalia e outras anormalidades, como defeitos visuais, deficiência auditiva, deformidades esqueléticas e epilepsia, e ocorre em 6% a 12% dos casos de gestantes infectadas pelo ZIKV (FRANÇA et al., 2016). Estas observações sugerem que a infecção pelo ZIKV durante a gravidez não é completamente responsável pelo fenótipo da SCZ e outros fatores de suscetibilidade podem estar envolvidos. Estudos realizados por Mc Grath e colaboradores demonstraram que NPCs de diferentes indivíduos poderiam responder diferentemente à infecção pelo ZIKV. Isto foi observado pela modulação diferencial das vias de sinalização intracelular, especialmente as relacionadas à imunidade inata, ciclo celular e sinalização pela via mTOR (MCGRATH et al., 2017).

Os vírus podem atingir o cérebro através de diferentes mecanismos, incluindo o sistema nervoso periférico e transporte axonal, além da via hematogênica. Dada a natureza sistêmica da infecção por flavivírus, e o fato de que a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) é frequentemente observada em modelos experimentais de infecção, acredita-se que o cruzamento dessa estrutura seja um mecanismo importante para a neuroinvasão dos flavivírus (JURADO et al., 2018; VERMA et al., 2010; WANG et al., 2018). A BHE é uma estrutura

complexa, composta por células endoteliais da microvasculatura cerebral (BMECs), que estão associadas a pericitos, astrócitos e microglia (DA CONCEIÇÃO et al., 2013; MINKIEWICZ; DE RIVERO VACCARI; KEANE, 2013; SOFRONIEW, 2015).

Jurado e colaboradores investigaram o papel da deficiência de IFNAR em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas em um modelo de infecção por ZIKV em camundongo. Estes pesquisadores demonstraram que a resposta do IFN por células não hematopoiéticas era essencial para proteção contra disseminação viral no cérebro, a ruptura da BHE e a neuropatologia induzida pelo ZIKV. Já a paralisia induzida pelo vírus foi dependente da infiltração de células LT CD8⁺ no cérebro, indicando que a infiltração de leucócitos devido à ruptura da BHE pode ser um fator relevante na neuropatogênese. A inoculação de ZIKV no 14º dia do período embrionário, em camundongos C57BL/6, afetou o desenvolvimento neurovascular, resultando em microcefalia pós-natal e dano cerebral. A análise dos cérebros no período pós-natal indicou um aumento significativo na densidade e diâmetro dos vasos no córtex cerebral, com evidências de permeabilidade da BHE. Além disso, os cérebros exibiram extensa ativação microglial, astrogliose e altos níveis de IL-1 β e TNF- α , sugerindo que uma resposta imune excessiva também pode prejudicar o desenvolvimento neurovascular, levando ao aumento da permeabilidade da BHE e danos cerebrais (SHAO et al., 2016). Os mediadores produzidos após a ativação da BMEC ou após o dano no SNC afetam a função dos astrócitos. Além disso, essas células podem ser diretamente infectadas e ativadas por vírus, promovendo uma resposta denominada astrogliose, no qual há produção citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (CHANG et al., 2015; HUSSMANN et al., 2012). Esses mediadores modulam a angiogênese, afetam a expressão e organização das proteínas de junção celular, restringem ou estimulam a infiltração de leucócitos e causam impacto na função neuronal (ARGAW et al., 2012; SOFRONIEW, 2015; ZAMANIAN et al., 2012). Assim, insultos como infecção viral e inflamação podem estimular as BMECs, astrócitos, microglias e outras células a secretarem mediadores que afetam a integridade da BHE e a função do SNC (ALVAREZ; KATAYAMA; PRAT, 2013; ARGAW et al., 2012; FABRY et al., 1995; HEINEMANN; KAUFER; FRIEDMAN, 2012).

Dada a natureza sistêmica da infecção por flavivírus e a função fisiológica da BHE, acredita-se que a ruptura da barreira seja um evento determinante que precede a invasão viral. Um ponto importante que sustenta essa concepção é que as BMECs, que são os principais tipos celulares na BHE, são suscetíveis a todos os flavivírus neurotrópicos (JEV, WNV e ZIKV) e a infecção induz a apoptose (DA CONCEIÇÃO et al., 2013; LAZEAR et al., 2015; PAPA et al.,

2017a; VERMA et al., 2009; WANG et al., 2008a, 2008b). Porém, evidências crescentes sugerem que os flavivírus também podem alcançar o SNC cruzando a BHE sem rompê-la. A liberação basolateral de partículas infecciosas após a replicação do vírus em BMECs foi descrita em diferentes modelos experimentais, nos quais nenhum efeito citopático significativo foi detectado (PAPA et al., 2017a; VERMA et al., 2009). Sugere-se que o ZIKV pode atravessar a barreira endotelial como vírus livre de células ou também pode atingir o SNC como partícula associada a células, através de um mecanismo chamado “cavalo de Tróia”. Neste contexto, os leucócitos periféricos infectados transmigram através da camada de células endoteliais e liberam vírus dentro do SNC. Após a entrada no cérebro por qualquer uma das vias descritas, os flavivírus podem infectar os astrócitos, microglias, pericitos e neurônio. A infecção dessas células, especialmente astrócitos e microglias, induz a liberação de mediadores inflamatórios e metaloproteinases que medeiam a regulação negativa de proteínas de junção celular, resultando em aumento da permeabilidade (MUSTAFÁ et al., 2019). A invasão viral no SNC por todos esses mecanismos é frequentemente seguida por infiltração de leucócitos. Tanto a replicação viral em neurônios quanto a resposta inflamatória local desencadeada posteriormente foram relatadas como sendo relevantes na neuropatogênese da infecção por flavivírus. A inflamação subsequente induzida após a invasão do SNC pelo vírus também pode contribuir para a degradação da BHE e amplificar todo o processo (DOUAM et al., 2017; LI et al., 2015; LUCAS et al., 2018; ROE et al., 2012; VELANDIA-ROMERO; ACOSTA-LOSADA; CASTELLANOS, 2012; WANG et al., 2018).

A infecção pelo ZIKV induz neuroinflamação na microglia, culminando na produção de IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFNs, óxido nítrico sintase (iNOS) e NO. A expressão dessas citocinas foi detectada no tecido cerebral fetal primário de pacientes infectados pelo ZIKV (LUM et al., 2017). Por outro lado, confirmam e ampliam a observação de que a infecção por flavivírus induz a produção de uma ampla gama de mediadores pró- inflamatórios pelas células microgliais, como mostrado anteriormente em um modelo animal experimental de JEV (GHOSHAL et al., 2007). Já foi mostrado que a infecção pelo ZIKV é capaz de desregular a progressão do ciclo celular e induzir apoptose, além de causar morte neuronal através da produção de altos níveis de NO, o que pode contribuir com os distúrbios neurológicos causados pelo ZIKV (BROWN; VILALTA, 2015; GARCEZ et al., 2016; LI et al., 2016a; TANG et al., 2016). O acúmulo de citocinas e quimiocinas consistente com a forte resposta inflamatória, contribui para o dano tecidual, e tem sido hipotetizado como causador das doenças autoimunes decorrentes da infecção pelo ZIKV, como a GBS (CAO- LORMEAU et al., 2016). Por fim,

pode-se destacar o importante papel da microglia na neuroinflamação e no metabolismo lipídico durante a infecção pelo ZIKV. A síntese de metabólitos lipídicos por essas células pode contribuir para a produção de citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel crucial na neuroinflamação induzida pelo ZIKV (DIOP et al., 2018).

1.1.8.1 SNC e Micróglia

As micróglia distribuem-se no encéfalo e na medula espinhal, representando cerca de 5 a 20% de todas as células da glia. Em contraste com as outras células da glia, a micróglia tem origem mesodérmica, derivando da linha hematopoiética (GRAEBER; STREIT, 2010; HUBER et al., 2013; SAIJO; GLASS, 2011). Sua morfologia é distinta quando comparada com os macrófagos presentes em outros tecidos, apresentando muitos prolongamentos finos e curtos, o que permite uma elevada área de contacto com o meio circundante. Esta morfologia ramificada reflete o estado residente da micróglia. Por outro lado, em condições de fagocitose, frente a uma lesão do SNC, adquirem uma morfologia semelhante à dos macrófagos, esférica e sem prolongamentos, contendo numerosos vacúolos fagocitários, sendo designada micróglia ativada ou micróglia amebóide (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013). Porém, embora a ativação microglial possa ser acompanhada por alterações morfológicas, não se pode prever com precisão a função que está sendo realizada por uma célula microglial somente analisando sua morfologia (GORDON; MARTINEZ, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008; SCHWARTZ et al., 2006).

Durante o desenvolvimento encefálico, a micróglia dá suporte à sinaptogênese através da síntese de fatores neurotróficos, da regulação e remodelamento da transmissão sináptica (POLLARD, 2004). Além disto, auxilia na sobrevivência dos neurônios através da liberação de diversos fatores, como o Fator de Crescimento do Nervo (NGF), o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β), entre outros (SAIJO; GLASS, 2011). Por fim, a micróglia também auxilia a remielinização, a oligodendrogênese e a angiogênese, além de controlar diretamente a morte neuronal (OUSMAN; KUBES, 2012). Por outro lado, sabe-se que a atividade neuronal e o seu microambiente controlam o estado quiescente da micróglia, e a sua própria atividade é alvo da supervisão neuronal. Os neurônios suprimem a ativação da micróglia por intermédio do contato célula-a-célula, através da liberação de moléculas como, por exemplo, o ligante da quimiocina CX3C (CX3CL1) e, ainda, por proteínas regulatórias expressas na sua superfície, como CD47, CD200, CD22 (SAIJO; GLASS, 2011). Além disso, as micróglia são as

principais células imunes no SNC, sendo consideradas os macrófagos do SNC, pois podem ser ativadas por uma ampla variedade de estímulos patológicos, incluindo trauma, inflamação, degeneração e isquemia, além de fatores físicos, como radiação eletromagnética, radiação ionizante e infrassom (GIULIAN et al., 1989; GONZÁLEZ-SCARANO; BALTUCH, 2002; ITO et al., 1998; MCGEER; MCGEER, 1995; MOORE; THANOS, 1996).

O método clássico de classificação de macrófagos foi aplicado à micróglia, categorizando os estados de ativação como M1 (pró inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório), conforme a figura 10 (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013; LOANE; KUMAR, 2016; YOUNGER et al., 2018). A micróglia M1 sintetiza mediadores pró inflamatórios, como TNF- α , IL-6, NO e ROS (DING; NATHAN; STUEHR, 1988). Já a micróglia M2, que produz citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, promove a remodelação da matriz extracelular, angiogênese, reparo tecidual e regeneração (SICA et al., 2006). A mudança de um estado inflamatório agudo para anti-inflamatório, leva ao reparo tecidual e à homeostase, enquanto uma resposta inflamatória prolongada e não resolvida resulta na morte das células neuronais, causando dano tecidual e, em última análise, o início de doenças neurodegenerativas (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; GLASS et al., 2010; JHA; LEE; SUK, 2016). Nas doenças neurodegenerativas, a inflamação causada pela micróglia tem sido relatada como a principal causa de comprometimento cognitivo. (HANISCH; KETTENMANN, 2007; JHA; LEE; SUK, 2016).

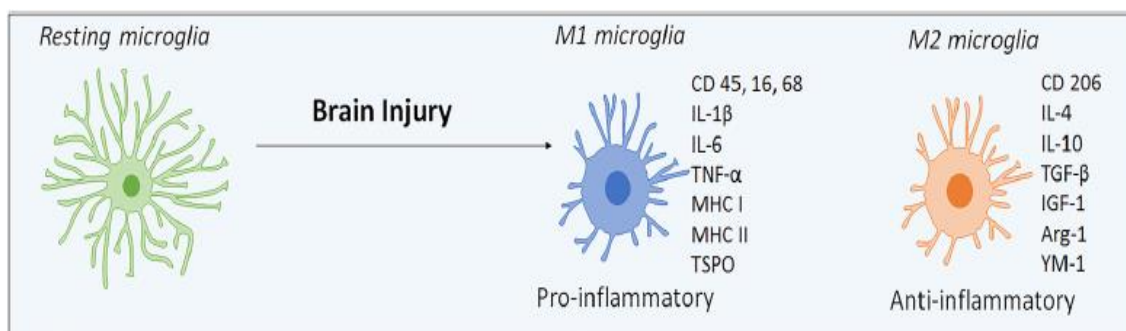


Figura 10. Marcadores de ativação microglial decorrente de lesão cerebral. A imagem retrata os dois estados de ativação microglial: M1 e M2, e seus respectivos marcadores de identificação. Adaptado de Younger et al, 2018.

Os marcadores mais usados na identificação da micróglia são o cluster de diferenciação 45 (CD45), CD11b, CD68 (também denominado macrossialina), MHC-II e a Molécula Adaptadora de Ligação ao Cálcio Ionizado 1 (Iba-1) (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013). CD68 é uma glicoproteína transmembranar lisossomal/endossomal de 110 kDa expressa nas

células da linhagem hematopoiética mielóide, incluindo a micróglia, sendo regulada pela via mTOR (HOLNESS; SIMMONS, 1993; MATSUMOTO et al., 2007; SHEN; SIDIK; TALBOT, 2016). A micróglia quiescente expressa níveis baixos de CD68, porém sua expressão sofre acentuada elevação na micróglia ativada em todo o cérebro, sendo frequentemente usado como um marcador de ativação microglial (TANAKA et al., 2013; VAN VLIET et al., 2012). Porém, Zhao e colaboradores observaram um aumento de CD68 sem o correspondente aumento da expressão de citocinas inflamatórias, o que indica que a micróglia ativada não necessariamente apresenta perfil inflamatório (ZHAO et al., 2018). Assim como o CD68, o MHC-II, expresso por todas as células apresentadoras de antígeno, também tem baixa expressão na micróglia quiescente, elevando na micróglia ativada (GRAEBER; SCHEITHAUER; KREUTZBERG, 2002; OUSMAN; KUBES, 2012). Já Iba1 é uma proteína de 17 kDa de expressão constitutiva específica da micróglia, também regulada positivamente durante as respostas reativas, que possui um papel importante na mobilidade celular e fagocitose (IMAI et al., 1996; ITO et al., 2011; OHSAWA et al., 2000).

1.2. Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPARs)

PPARs são fatores de transcrição da família de receptores nucleares controladores de vários genes envolvidos no metabolismo de lipídeos que, por sua vez, estão envolvidos na proliferação celular, nas respostas inflamatórias, na aterosclerose, na carcinogênese, na lipogênese, na sensibilidade a insulina e oxidação de ácidos graxos. Esses receptores foram classificados em três isoformas: PPAR α , PPAR γ e PPAR β/δ . Os PPARs possuem três domínios principais: o amino terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD). Uma pequena região de dobradiça une o DBD a LBD (BERGER; MOLLER, 2002; DESVERGNE; WAHLI, 1999).

O domínio amino terminal é bastante variável, tanto em sua sequência como no seu tamanho, entre os receptores nucleares. Essa região tem função transcricional independente da presença de um ligante, e é chamada de função de ativação 1 (AF-1). O DBD é a região mais conservada entre todos os receptores nucleares. Este domínio está localizado na região central do receptor e é organizado por dois segmentos estruturais que possuem domínios dedos de zinco. Eles são separados por uma sequência de 15 a 17 aminoácidos, em que os três primeiros aminoácidos do primeiro dedo (caixa P ou *P-box*) são responsáveis pelo reconhecimento da

região do DNA onde cada receptor se ligará. Essa região é chamada de elemento responsivo. No segundo dedo de zinco, há uma sequência de cinco aminoácidos (caixa D ou *D-box*). Esta região é importante para a dimerização do receptor. Já o LBD, é menos conservado e varia de acordo com o receptor nuclear. Este domínio está localizado na região carboxi-terminal do receptor e é responsável pela homodimerização ou heterodimerização do receptor, pela interação com proteínas co-repressoras e co-ativadoras no núcleo, além de conter uma região chamada de função de ativação 2 (AF-2) que, após a ligação do ligante, permite a formação de um complexo proteico envolvido na ativação da transcrição (BARRA et al., 2005; EVANS, 2005). A figura 11 mostra a representação esquemática de um receptor nuclear.

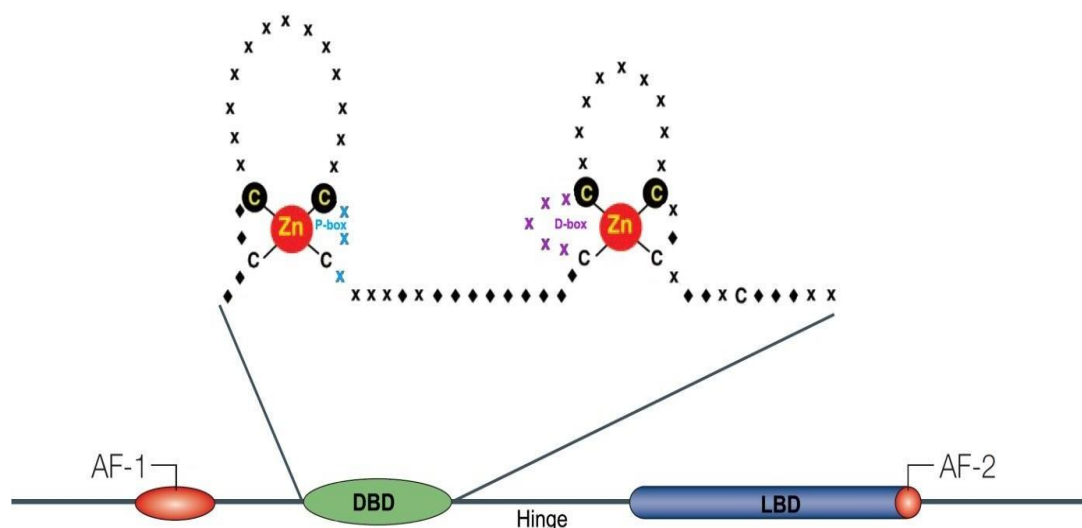


Figura 11. Modelo da estrutura do receptor nuclear. Modelo estrutural de um receptor nuclear mostrando as diferentes regiões da proteína: domínio de ligação ao DNA (DBD); região responsável pelo reconhecimento do elemento responsivo ao DNA (*P-box*); região responsável pela dimerização do receptor (*D-box*); domínio de ligação ao ligante (LBD); função de ativação 1 (AF-1); região de dobradiça (*Hinge*); função de ativação 2 (AF-2) e região relacionada ao recrutamento de fatores transcripcionais após a ligação do ligante ao receptor. **Adaptado de Evans, 2005.**

Por serem fatores ligante-dependentes que regulam a expressão gênica, os PPARs precisam formar um heterodímero com o receptor do ácido 9-*cis*-retinóico (RXR). O heterodímero PPAR/RXR pode ser formado na ausência de ligante, ficando inativo. Quando o ligante se liga ao heterodímero PPAR/RXR, ocorre a ativação da transcrição de genes específicos por meio da ligação do heterodímero ao elemento responsivo do PPAR (PPRE) (Figura 12) (BERGER; MOLLER, 2002; FEIGE et al., 2006). Já foi demonstrado que a ativação do PPAR γ atenua a inflamação associada à insultos neurológicos crônicos e agudos, o que despertou interesse sobre o potencial terapêutico de agonistas do PPAR em condições agudas,

como acidente vascular cerebral, lesão medular e lesão cerebral traumática, na qual a inflamação maciça desempenha um papel prejudicial. As Tiazolidinedionas (TZDs), como a Rosiglitazona, são potentes agonistas exógenos de PPAR, devido às suas propriedades sensibilizantes à insulina. A Rosiglitazona é um fármaco agonista específico de PPAR γ , para o tratamento de diabetes tipo 2. Kapadia e colaboradores mostraram que os TZDs induzem neuroproteção significativa em modelos animais de isquemia focal e lesão medular. As ações benéficas dos TZDs foram observadas como dependentes e independentes de PPAR γ . O principal mecanismo de neuroproteção induzida por TZD parece ser a prevenção da ativação microglial e da expressão de quimioquinas e citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6. Também demonstrou-se que as TZDs impedem a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, ao mesmo tempo que promovem os mecanismos antioxidantes no SNC lesado (KAPADIA, 2008).

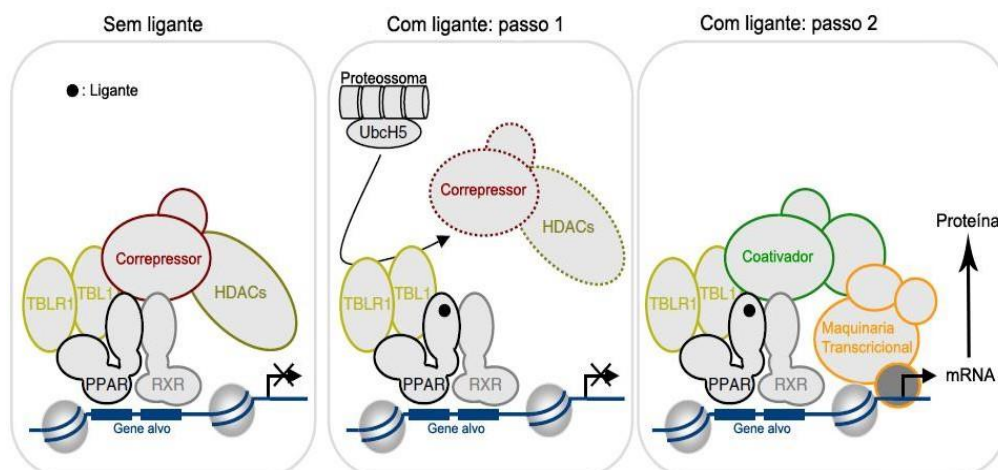


Figura 12. Mecanismo de ação do PPAR. O heterodímero PPAR/RXR, na ausência de ligante, fica no estado inativado e ligado ao correpresor (Sem ligante). Esse correpresor está associado à enzima histona deacetilase (HDAC), que mantém a histona em um estado hipoacetilado, mantendo o DNA compactado. Os fatores nucleares de mudança nos correpresores (NCoEx), TBL1 e TBLR1, também estão ligados ao receptor. Na presença do ligante, NCoEx recruta a enzima de conjugação ubiquitina E2 (UbcH5), juntamente com a maquinaria de ubiquitinação, para induzir a ubiquitinação e, subsequentemente, a degradação proteossomal do correpresor (Com ligante: passo 1). Assim, o NCoEx facilita a saída do correpresor, possibilita o recrutamento eficiente e a ativação transcritora (Com ligante: passo 2). **Adaptado de Feige, 2006.**

Está bem demonstrado que alguns receptores nucleares, como receptor de glicocorticóide e os PPARs α , β/δ e γ , modulam a resposta inflamatória em diversos tecidos, incluindo macrófagos e células do sistema nervoso (BRAISSANT et al., 1996; FORMAN; CHEN; EVANS, 1997; ISSEMANN; GREEN, 1990). Estes receptores desempenham um papel crucial

no controle da resposta inflamatória pela inibição da expressão de genes pró-inflamatórios. A ativação da sinalização dos PPARs, particularmente das isoformas α e γ , pode suprimir diretamente a resposta inflamatória através da inibição da via NF- κ B, por meio da ligação às suas subunidades, p50 e p65 (ROSSI et al., 2000). Além da supressão direta, PPAR pode também inibir a via NF- κ B indiretamente, competindo com seus coativadores transcricionais, como por exemplo p300/CBP, regulando positivamente o inibidor kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$), ou ativando a transcrição do fator Nrf2, que reduz as moléculas oxidativas necessárias para a ativação de NF- κ B (CHUNG et al., 2008; DELERIVE et al., 2000; DOWELL et al., 1997; ZHAO; GONZALES; ARONOWSKI, 2015; ZOLEZZI et al., 2017). Além de NF- κ B, PPAR também regula a transrepressão das atividades inflamatórias de AP-1, STAT-1 e do fator nuclear de linfócitos T ativados (NFAT), inibindo assim a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, como ICAM-1 e MMP-9 (BERNARDO; MINGHETTI, 2007; CHEN et al., 2003; CHUNG et al., 2008; RICOTE; GLASS, 2007; WANG et al., 2010).

Adicionalmente, as três isoformas de PPAR podem participar do controle da resposta inflamatória, sendo expressos em diversos tecidos, incluindo o tecido nervoso central, estando presentes no hipocampo, corpo estriado, núcleo hipotalâmico paraventricular, gânglios da base, tálamo e córtex piriforme (MOUNSEY et al., 2015; RICOTE; GLASS, 2007). O receptor PPAR α é expresso em hepatócitos, enterócitos, macrófagos, células endoteliais, linfócitos e em células da glia (TYAGI et al., 2011). Já a isoforma PPAR β/δ , é expressa na musculatura esquelética, adipócitos, pulmões, pele, macrófagos e cérebro, promovendo o metabolismo de ácidos graxos e reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (TYAGI et al., 2011). O PPAR γ é o subtipo mais estudado, possuindo papel central no processo de diferenciação dos adipócitos, utilização da glicose periférica e sensibilização à insulina. Esta isoforma é expressa principalmente no tecido adiposo branco e marrom e, em menor grau, em outros tecidos, incluindo o SNC (BRAISSANT et al., 1996; CHAWLA et al., 1994; RIZZO; FIORUCCI, 2006). Por outro lado, PPAR γ diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias em diversos tipos celulares, incluindo monócitos/macrófagos, células endoteliais, células dendríticas, linfócitos e micróglia (RICOTE; GLASS, 2007).

Já foi mostrado que o PPAR- γ é expresso na micróglia, inclusive na linhagem celular murina BV2, mediando a atividade antiinflamatória e induzindo a polarização microglial para o fenótipo M2 (LI-HUA et al., 2017; MALCHIODI-ALBEDI et al., 2008; PISANU et al., 2014; SAIJO; CROTTI; GLASS, 2013). Em resumo, o PPAR γ exerce efeitos neuroprotetores através

da redução das respostas inflamatórias na micróglia e astrócitos, do bloqueio as vias amiloidogênicas, da indução da diferenciação neuronal e do crescimento de neuritos, além de inibir a apoptose, o dano oxidativo, a inflamação e a disfunção mitocondrial (CHATURVEDI; BEAL, 2008; CHIANG et al., 2014; SAIJO; CROTTI; GLASS, 2013; ZOLEZZI et al., 2017). Vários estudos confirmam o efeito anti-inflamatório de PPAR γ no tratamento da doença de Parkinson, da doença de Alzheimer e da lesão aguda de medula espinhal (HENEKA; LANDRETH, 2007; KAPADIA, 2008; KUMMER; HENEKA, 2008; VAN NEERVEN; MEY, 2007). Inclusive, a indução de PPAR- γ nas células BV2 tratadas com LPS mostrou efeitos antiinflamatórios mediados pela inibição da ativação da via NF- κ B (CHOI et al., 2017; LI-HUA et al., 2017). Outro estudo mostrou que na micróglia ativada por LPS, o PPAR- γ foi capaz de suprimir a expressão de iNOS, COX-2 e citocinas pró-inflamatórias, ao passo que aumentou a IL-10, uma citocina antiinflamatória, que regula a polarização de macrófagos M1 para o fenótipo M2 (LOBO-SILVA et al., 2016). A IL-10 desempenha um papel chave na inibição, mediada por PPAR- γ , através da inibição de STAT-1 dependente de MyD88, a principal proteína adaptadora para TLRs. Portanto, bloqueando MyD88 através do eixo PPAR- γ /IL-10, pode-se inibir a sinalização excessiva de TLR e melhorar o resultado da inflamação, o que sugere uma “conversa” entre PPARs e TLRs, a fim de regular a resposta inflamatória em resposta à diferentes doenças (DANA; VASEGHI; JAVANMARD, 2019).

Já as propriedades anti-inflamatórias do PPAR α , foram descritas tanto na micróglia como em astrócitos, atenuando a inflamação na gliose reativa, reduzindo a produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias (IGLESIAS; MORALES; BARRETO, 2017; RICOTE; GLASS, 2007). Existem poucos relatos na literatura a respeito da ação de PPAR sobre as infecções causadas por flavivírus, porém Sehgal e colaboradores mostraram que o fenofibrato, um medicamento hipolipêmico agonista de PPAR α , foi capaz de reduzir em 80% a mortalidade de camundongos infectados com JEV, além de prevenir déficits neurológicos nos camundongos sobreviventes. Além disso, a administração do fenofibrato causou uma redução nos títulos virais, tanto in vitro como in vivo (SEHGAL et al., 2012).

1.2.1. PPARs, Peroxissomos e Flavivírus

Além de se explorar os mecanismos anti-inflamatórios mediados por PPAR, é importante citar que este receptor também participa da biogênese de peroxissomos. Apesar da biogênese peroxissomal ser controlada principalmente pelos genes da peroxina, PPAR é capaz de sintetizar peroxissomos “de novo” através da fusão de vesículas pré-peroxissômicas derivadas do retículo endoplasmático com mitocôndrias. Visto que o metabolismo lipídico é alterado frente à infecções virais, e que as infecções causadas por flavivírus reduzem o número e a atividade dos peroxissomos, é possível que PPAR possa estar envolvido no processo de manipulação da expressão de peroxissomos induzido durante infecções virais. Porém, até o momento, apenas PPAR α é conhecido por induzir a biogênese peroxissomal, enquanto o papel das isoformas γ e β/δ na biogênese do peroxissomo permanece controverso (DIXIT et al., 2010; MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ, 2016; SCHRADER et al., 2016). É importante destacar, ainda, que a via mTOR está relacionada com a indução da expressão de PPAR γ . Thelen e colaboradores demonstraram que a inibição de mTOR, que ZIKA é capaz de fazer, previne a ativação de PPAR γ (THELEN; ZONCU, 2017). Além disso, já foi mostrado que o eixo de sinalização mTOR/PPAR γ é essencial para a ativação metabólica de ácidos graxos em linfócitos TCD4⁺ ativados (ANGELA et al., 2016).

Os peroxissomos são organelas multifuncionais com funções no metabolismo celular, processamento lipídico, citotoxicidade e sinalização da resposta imune inata (COYAUD et al., 2018; ODENDALL; KAGAN, 2013; TANNER et al., 2014). O metabolismo peroxissômico é crucial para o desenvolvimento e a função cerebral adequados, e é sabido que alterações patológicas do sistema nervoso são características proeminentes da maioria dos distúrbios peroxissômicos (BERGER et al., 2016). De fato, há um número crescente de estudos sugerindo que os peroxissomos são atores-chave na sinalização antiviral (DIXIT et al., 2010; ODENDALL; KAGAN, 2013). Além disso, as modificações nos níveis plasmáticos e na atividade peroxissômica induzidas por vírus já foram descritas a nível celular (DIXIT et al., 2010; FAROOQUI; HORROCKS, 2001; MARTIN-ACEBES et al., 2014; SATOH et al., 1990). You e colaboradores mostraram que a infecção por flavivírus, como WNV e vírus da dengue (DENV), resulta em perda significativa de peroxissomos em células de mamíferos por sequestro dependente da proteína do capsídeo e/ou degradação do fator de biogênese peroxissômico PEX19 (YOU et al., 2015). Existem evidências crescentes que mostram que a infecção por DENV altera vias metabólicas, incluindo a biossíntese de ácidos graxos e β -oxidação, o catabolismo de fosfolipídios e a via do hormônio esteroide, e que essas alterações

específicas no perfil lipídico estão associados à dengue grave (DURÁN et al., 2015; VAN GORP et al., 2002). Ainda, Coyaud e colaboradores revelaram que a NS2A do ZIKV é direcionada especificamente para as membranas dos peroxissomos (COYAUD et al., 2018). Além disso, a infecção pelo ZIKV ou a expressão de isolada de NS2A diminuíram a densidade dos peroxissomos nas células hospedeiras, e a replicação do ZIKV foi significativamente prejudicada nas células com deficiência de peroxissomo. Juntos, esses dados sugerem que o NS2A tem como alvo os peroxissomos para remodelar as populações de lipídios das células hospedeiras e/ou efetuar a evasão viral da resposta imune inata do hospedeiro, como já mostrado anteriormente para DENV e WNV (YOU et al., 2015).

2. Relevância da Pesquisa

Nos últimos anos, o surgimento, ou ressurgimento, de diferentes arboviroses gerou um alerta global. Um exemplo é o ZIKV, que em 2015 ocasionou um surto epidêmico no Brasil, o qual se propagou para outros países da América atingindo mais de 1,5 milhão de casos, o que levou a OMS declarar uma emergência de saúde pública global em fevereiro de 2016 (WHO, 2017). Os primeiros estudos em cérebros de recém-nascidos expostos ao ZIKV no período pré-natal mostraram consequências devastadoras, incluindo microcefalia, hidrocefalia, necrose, calcificação periventricular e cortical, astrogliose difusa e ativação da micróglia, conhecida como síndrome congênita do Zika (SCZ) (BRITO, 2016). Também foram relatadas outras alterações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. Apesar da linhagem africana - ZIKV_{MR766} - apresentar maiores taxas de infectividade e replicação em CPN e induzir maiores defeitos na proliferação e apoptose celular, não foram relatados casos de CSZ associados a esta linhagem. Estes dados, em conjunto com a ocorrência de CSZ em 6% a 12% das gestantes infectadas pelo ZIKV, sugere o envolvimento de outros mecanismos patogênicos e fatores de suscetibilidade. Por outro lado, os receptores nucleares PPARs sabidamente modulam a resposta inflamatória, além de participar da biogênese de peroxissomos, organelas que servem tanto ao hospedeiro, quanto à maquinaria de replicação viral (COOK et al., 2019). Já foi sugerido que os PPARs podem estar envolvidos no processo de manipulação da expressão peroxissomos, induzido durante infecções virais, porém pouco se sabe sobre a ação deste receptor durante infecções causadas por flavivirus e ainda não existem trabalhos mostrando o impacto da infecção pelo ZIKV nestes receptores. Além disso, as diferenças entre as linhagens africana e asiática quanto à virulência e patogênese, proporcionam uma oportunidade única para

esclarecer os mecanismos moleculares associados doença ou proteção, incluindo a contribuição de diferenças de sequência na virulência, tropismo tecidual, patologia, e evasão imune. Dentro deste contexto, um estudo molecular mais aprofundado se faz necessário para esclarecer o papel de PPAR α e γ na infecção da micróglia BV-2 pelas principais linhagens do ZIKV.

3. Objetivos

Avaliar a expressão diferencial do receptor nuclear PPAR α e γ , e seus respectivos alvos nos mecanismos moleculares e imuno-inflamatórios relacionados à infecção de células da micróglia - BV2 - pelas linhagens africana e asiática do ZIKV.

3.1. Objetivos específicos

- a. Produzir partículas virais infecciosas das linhagens ZIKVMR766 e ZIKVPE243;
- b. Infectar células de micróglia da linhagem BV-2 com ZIKV e avaliar a citotoxicidade;
- c. Analisar a cinética de replicação das linhagens ZIKVPE243 e ZIKVMR766 em BV2;
- d. Avaliar a expressão de marcadores de ativação de células BV2 em resposta à infecção por ZIKVPE243 e ZIKVMR766 comparando com as não infectadas;
- e. Analisar a expressão de PPAR α e γ , miR-146a e mediadores inflamatórios nas células infectadas com ZIKV.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultura de células

Linhagem celular de micróglia de cérebro de camundongo C57BL/6, BV2, foi comprada do Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ 0356, lote 001228). As células são semi-aderentes cultivadas em meio RPMI-1640 (LGC, código: BR30255-05), acrescido de L-Glutamina 2,05 mM, hepes 25 mM, bicarbonato de sódio 2 g/L e 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, código: 12657-029), pH 7,4.

Células C6/36 (linhagem celular de glândula da larva do mosquito *Aedes albopictus*), gentilmente cedidas pelo Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Instituto de Biologia, UnB), foram cultivadas em meio TC-100 (Vitrocell Embriolife, lote 005/16) acrescido de bicarbonato de sódio, L-glutamina, antibiótico, antimicótico, triptose Broth e 5% de SFB, pH 7,3.

Células Vero (linhagem celular de epitélio de rim de macaco verde africano) foram mantidas em meio DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco, código

31600-026) suplementado com L-glutamina, piruvato de sódio, 2,5% de hepes, 5% de SFB e 1% penicilina- estreptomicina, pH 7,2.

Todas as células foram mantidas em estufa úmida a 37°C com injeção de 5% de CO₂, com exceção das C6/36, que foram mantidas em incubadora a 28°C sem CO₂.

4.2. Manutenção e propagação do vírus Zika

Foram utilizados ZIKV provenientes de duas linhagens distintas, a cepa de referência africana isolada de macaco - ZIKVMR766 (ATCC VR1838) - e um isolado humano brasileiro de Pernambuco - ZIKVPE243 (KX197192) -, gentilmente cedidos pela Dra. Luciana Barros de Arruda (Instituto de Microbiologia, UFRJ). Para propagação viral, células C6/36 ou Vero foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² *overnight* até atingirem 70% de confluência. As células foram, então, incubadas com os vírus em multiplicidade de infecção (MOI) 0,01 em 5 mL de meio TC-100 ou DMEM sem SFB. Após 2h de adsorção viral foi acrescentado 10 mL de meio TC-100 com 2% de SFB (C6/36) ou 10 mL de meio DMEM com 2% de SFB (Vero). As células foram mantidas a 28°C (C6/36) e 37°C (Vero). Após sete dias de infecção, os sobrenadantes das células foram coletados e centrifugados, os pellets foram descartados, os vírus foram concentrados e filtrados em filtro de 0,22 µm, e, finalmente, aliquotados e armazenados a -80°C. Os títulos dos vírus estoque foram determinados por ensaio de placa de lise em células Vero (COELHO et al., 2017).

4.3. Titulação viral por ensaio de placa de lise (PFU)

Foram plaqueadas 4×10^4 células Vero por poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, se as células apresentassem 70% de confluência, prosseguia-se com o ensaio. Em seguida, as células foram cultivadas com diluições seriadas das amostras de ZIKV, em meio DMEM sem SFB. Após 2h de incubação sob leve agitação, os poços foram lavados com PBS, e o meio da infecção foi substituído por meio DMEM com 1,5% de carboxi-metil-celulose (CMC – ThermoFisher) e 1% de SFB. As placas foram, então, incubadas por 5 dias a 37°C. Após esse período, as células foram fixadas com formaldeído 10% *overnight* e coradas com cristal violeta 1%, diluído em metanol a 20%, por 5 min. As placas de lise formadas foram contadas e o resultado expresso em log de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL) (CONTRERAS; ARUMUGASWAMI, 2016).

4.4. Infecção de BV2 com ZIKV

Células BV2 foram plaqueadas, em duplicata, em placas de 6 poços, na concentração de 2×10^4 células/ml por poço. No dia seguinte se as células apresentassem 70% de confluência prosseguia-se com o ensaio. Para manter o mesmo número de células, o sobrenadante é coletado e centrifugado, para reutilizar o pellet. As células foram lavadas com PBS e infectadas com os vírus ZIKVPE243 ou ZIKVMR766, em MOI de 1, diluídos em apenas 600 μ l de meio RPMI sem soro para aumentar o contato entre célula e vírus. Como controle, as células de um par de poços foram cultivadas com a mesma quantidade de meio de cultura sem soro. As placas foram incubadas por 2h a 37°C com leve agitação a cada 15 minutos para evitar que alguma parte do poço seque. Após a incubação, o meio com vírus é substituído por meio suplementado com 5% de SFB. As células são coletadas com 24, 48 e 72 horas pós infecção (p.i.). Como controle positivo de inflamação, as células são submetidas a 18 horas de tratamento com LPS [0,1 mg/ml] e em contato com ATP a 1 mM nos últimos 30 minutos.

4.5. Ensaio de viabilidade celular utilizando o teste de XTT

BV2 foram plaqueadas em placa de 96 poços, em triplicata, em uma concentração de 10^4 células por poço, infectadas com ZIKVPE243 ou ZIKVMR766, como descrito anteriormente, em MOI de 0,1, 1 e 5. Foi utilizado como controle negativo, células tratadas com meio de cultura RPMI sem SFB, designadas como “meio”, e tratadas com sobrenadante de células C6/36 não infectadas, chamadas de “mock”. Nos tempos de 1 a 7 dias após a infecção, as células foram diariamente incubadas com solução de 2,3-Bis- (2-metoxi-4- Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT) (Sigma- Aldrich) e Phenazine methosulfate (PMS) (Sigma-Aldrich) por 2 a 4 horas em estufa a 37°C. A metabolização foi avaliada no espectrofotômetro (SpectraMax) a 450 nm de densidade ótica (OD). Como controle positivo de morte, foi usado tratamento com 1% de Triton X100.

4.6. Avaliação da replicação viral

BV2 foram infectadas com os vírus ZIKVPE243 ou ZIKVMR766. Após o período de adsorção do vírus, um poço foi lavado com meio, que foi armazenado a -80°C e processado junto com as amostras para ser o controle de *input*, tempo 0 de infecção. A cinética de replicação viral em BV2 foi avaliada por RT-qPCR, nos tempos de 0, 8, 16, 24, 48 e 96 horas p.i., e ensaio de plaque, com os sobrenadantes dos tempos de 0, 16, 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas p.i.. Para análise de RNA viral intra e extracelular, extrato de células e sobrenadantes foram recolhidos para realizar a extração do RNA total pelo reagente LS TRIzol (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. Para realizar o ensaio de transcrição reversa (RT PCR) do RNA, foram utilizados 7,1 μL do RNA total obtido do sobrenadante. A concentração de RNA extraído do pellet foi quantificada e normalizada para uma quantidade entre 1-2 μg , de acordo com as recomendações do fabricante. Esse material foi misturado a 2,9 μL do mix do kit High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems), que utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos, seguindo o protocolo do fabricante, o qual segue os seguintes parâmetros no termociclador (Bio- Rad): 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C . Posteriormente, 5 μL do DNA complementar (cDNA) obtido foi submetido à PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para quantificação do RNA utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto para ambos os vírus. Foi utilizada uma curva padrão com diferentes concentrações de PFU para determinar a concentração equivalente de RNA. Os valores obtidos foram normalizados a partir da divisão pelos valores de *input*. Os primers utilizados estão descritos no quadro 1. Para análise da concentração de partículas virais infecciosas, os sobrenadantes recolhidos das infecções com vírus ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 foram utilizados no ensaio de titulação por placa de lise de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

4.7. Quantificação da expressão de PPAR γ e mediadores inflamatórios em BV2 infectadas, com e sem tratamento com Rosiglitazona

BV2 foram plaqueadas em placa de 6 poços, em uma concentração de 5×10^4 células por poço, e infectadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, como descrito anteriormente. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o extrato celular foi recolhido para extração de miRNA e mRNA com o kit mirVana PARIS (Protein and RNA Isolation System - Invitrogen, código AM1556), que separa os miRNAs dos RNAs >200nt da amostra, e ambos são eluídos em água livre de nucleasse e de inibidores de PCR. Para o experimento de infecção com tratamento de Rosiglitazona, as células BV2 foram plaqueadas e infectadas por ambos os isolados conforme descrito anteriormente, porém imediatamente após a infecção as células foram tratadas com Rosiglitazona em três concentrações diferentes: 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M. Após 48 horas de tratamento, o extrato celular foi recolhido para extração de mRNA com o kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, código RTN70). Para garantir uma ótima performance do ensaio, as amostras de mRNA extraídas foram corridas em gel de agarose livre de RNase para garantir que estavam íntegras e não contaminadas com DNA, e esse resultado é extrapolado para o seu correspondente miRNA. A concentração de mRNA e miRNA extraídos do péllet foi quantificada no fluorímetro Quantus (Promega) e normalizada para uma quantidade de 2 μ g para mRNA e 10 ng para miRNA, de acordo com as recomendações do fabricante.

O mRNA foi misturado a 5,8 μ L do mix do kit High-Capacity cDNA (Applied Biosystems), que utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos, seguindo o protocolo do fabricante como descrito anteriormente. O cDNA obtido foi diluído para concentração de 10ng/ μ L e 1 μ L da diluição foi submetida à qPCR. Para quantificar a transcrição de TNF- α , IL-6, IL-10, TRAF6 e CD68 foi utilizado o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 s e 60°C por 1 minutos, seguido de 95°C por 15 segundos. Para o ensaio, foram utilizados os primers descritos no quadro 1. A quantificação de GAPDH foi utilizada para padronizar a quantidade de células extraídas por ser um controle endógeno de expressão celular. Para quantificar a expressão de PPAR α e γ foi utilizado o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), e o primer comercial da ThermoFisher. A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos

e 60°C por 1 minuto. A quantificação de β -actina foi utilizada para padronizar a quantidade de células extraídas por ser um controle endógeno de expressão celular. Os valores de expressão relativa dos alvos em células infectadas foram normalizados a partir dos valores atingidos pelo controle endógeno celular e pelo controle negativo de infecção (mock) por cálculo de $\Delta\Delta CT$, corrigido com o valor da eficiência (PFAFFL, 2001).

Já o miR-146a foi misturado a 7 μ L do mix TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), que não utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos. Por isso, cada amostra é submetida a uma reação de transcrição reversa com primers específicos do microRNA que se deseja quantificar. Para a RT-PCR, segue os seguintes parâmetros no termociclador: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C. Posteriormente, 1 μ L do cDNA obtido foi submetido à qPCR utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), e o primer comercial da ThermoFisher. A reação foi realizada no aparelho StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores obtidos de expressão gênica foram normalizados a partir dos valores adquiridos do pequeno RNA nuclear endógeno U6 e controle negativo de infecção (mock) por cálculo de $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.8. Análise Estatística

A média e o desvio padrão foram calculados para cada situação experimental. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas usando a ferramenta de análise estatística do programa GraphPad Prism versão 5.0. Para todas as análises estatísticas os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.9. Análise qualitativa de CD68, Iba-1 e MHC-II por imunocitoquímica

Células BV2 foram plaqueadas por triplicata em lamínulas de vidro na placa de 24 poços, na concentração de 5×10^4 células por poço. As células foram infectadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, MOI 1. Como controle negativo, as células foram cultivadas nas mesmas condições já descritas anteriormente, já o controle positivo foi acrescido apenas de LPS. Para toda placa

ser fixada no mesmo dia, foi feita a infecção em tempo reverso, ou seja, infectamos a placa por três dias consecutivos. Assim, ao final do último dia, obtem-se poços com células infectadas a 24, 48 e 72 horas. Toda a placa foi lavada delicadamente com PBS aquecido a 37°C e todos os poços foram fixados com paraformaldeído (PFA) a 4% a temperatura ambiente *overnight*. As células foram permeabilizadas durante 4 min em PBS com 0,2% Triton X-100 e bloqueadas durante 30 min com 3% de BSA (Invitrogen) em PBS. Depois, as células foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-Iba1 (Wako, código 019-19741) diluído 1:1000, anti- CD68 (Bio-Rad, MC1957) diluído 1:100 e com anti-MHC II conjugado com PE (amarelo) (eBioscience, ref. 12-5322-81) diluído 1:1000. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos secundários com fluorescência AlexaFluor488 (verde) e AlexaFluor647 (rosa). Todas as incubações foram seguidas por lavagem extensiva com PBS. Para corar os núcleos, usamos meio de montagem contendo 4,6-diamidino-2- fenilindole (DAPI) (azul) (Vectashield - Vector Laboratories). A microscopia de fluorescência foi realizada toda ao mesmo tempo, com as mesmas soluções de anticorpo e todas as fotos foram tiradas com os mesmos ajustes do microscópio confocal Zeiss 710 equipado com uma objectiva de 63x e sistema de imagem digital (câmera Roper Scientific e software Zen Black).

Quadro 1. Sequência de iniciadores e sonda utilizados para ensaio de PCR em tempo real.

Primer	Orientação	Sequência
1086 ZIKV 1162c 1107	Senso	5'- CCGCTGCCCAACACAAG - 3'
	Anti-senso	5' - CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT – 3'
	Sonda FAM	5'-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3'
GAPDH	Senso	5'- AAGGGCTCATGACCACAGTC – 3'
	Anti-senso	5'- CAGGGATGATGTTCTGGGCA – 3'
IL-6	Senso	5'- TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTC – 3'
	Anti-senso	5' – TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC – 3'
TNF- α	Senso	5' – CCCTCACACTCAGATCATCTTCT – 3'
	Anti-senso	5' – GCTACGACGTGGGCTACAG - 3'
TRAF 6	Senso	5' – AAGATTGGCAACTTTGGATG – 3'
	Anti-senso	5' – GTGGGATTGTGGGTTCGCTG – 3'

5. Resultados e Discussão

5.1. Produção de Zika Vírus.

A linhagem do vírus brasileiro isolado em Pernambuco - ZIKV_{PE243} (KX197192) – foi propagada em células de mosquito C6/36. Já a linhagem de referência africana - ZIKV_{MR766} (ATCC VR1838) – foi produzida e titulada em células de macaco Vero. Os títulos obtidos foram 6×10^5 PFU/mL, como ilustrado na Figura 13, e $3,5 \times 10^7$ PFU/mL, respectivamente.

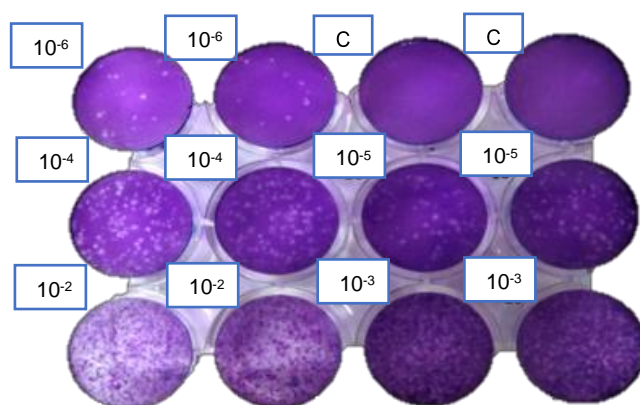


Figura 13. Titulação do ZIKV por ensaio de placa de lise (PFU). Imagem representativa de um ensaio em que células Vero foram infectadas por duplicata com diluições seriadas do ZIKV_{PE243} (10^{-2} - 10^{-7}). O controle negativo foi tratado com sobrenadante de C6/36 sem vírus. Após incubação de 5 dias, o meio semissólido imobiliza a partícula infecciosa e sua descendência a infectar apenas as células vizinhas e formar placas de lise celular contáveis. As placas de lise são zonas com células destruídas pela infecção, e podem ser evidenciadas por coloração das células viáveis com corante cristal de violeta 1%, após a fixação com formaldeído 10% das células aderentes. O resultado é expresso em log de unidades formadoras de placa por mL (PFU/ml).

5.2. ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} não induzem citotoxicidade em células BV2.

Para investigar qual seria a dose infecciosa letal de até 50% das células e escolher a dose viral a ser utilizada nos experimentos seguintes, foi realizado o ensaio de metabolização de XTT. As células BV2 foram infectadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} com MOI de 0,1, 1 e 5, incubadas com XTT diariamente por um período de 7 dias e a metabolização do substrato foi medida por leitura no espectrofotômetro.

Como pode ser observado na Figura 14, não foram encontradas diferenças significativas de morte nas BV2 infectadas com ambos os isolados entre os diferentes tempos e MOIs testados. Todas as leituras resultaram em aproximadamente 100% de metabolização do XTT, tanto em células infectadas, quanto nos controles negativos, designados como meio e mock. Como

controle positivo, as células tiveram a morte induzida por triton X100 1%, as quais obtiveram a viabilidade consideravelmente reduzida de forma proporcional à quantidade de células. A Figura 14A ilustra os resultados de viabilidade de BV2 infectada com ZIKV_{MR766}, enquanto a infecção por ZIKV_{PE243} foi ilustrada na figura 14B.

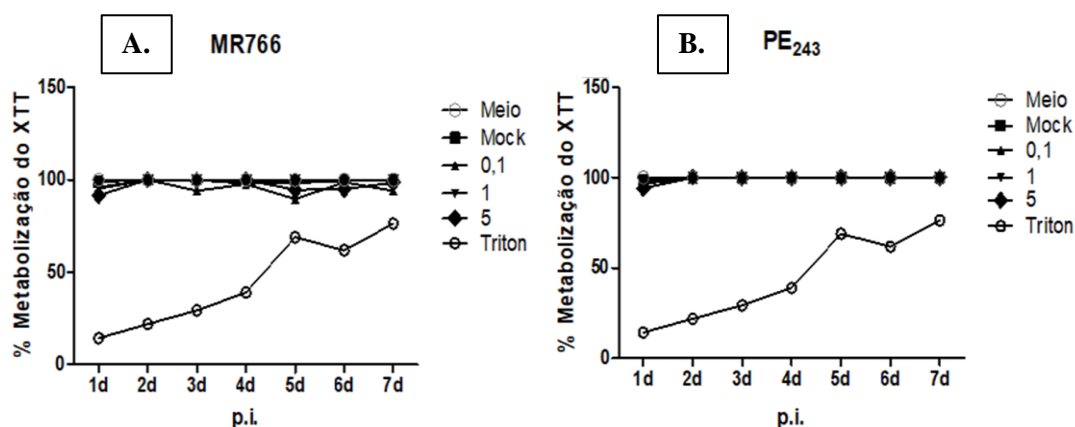


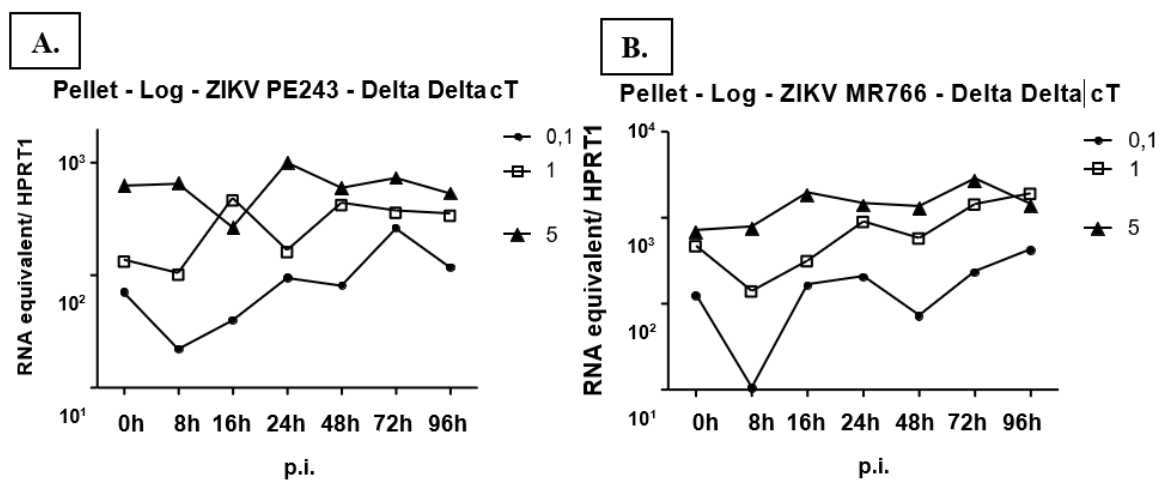
Figura 14. Viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de XTT. O teste de viabilidade celular foi realizado com MOIs de 0,1, 1 e 5, nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas pós infecção (1 a 7 dias p.i.) com o isolado africano ZIKV_{MR766} (A.) e com o isolado brasileiro ZIKV_{PE243} (B.). Os controles negativos foram designados como “meio” (RPMI) e “mock” (sup C6/36). O controle positivo teve a morte induzida por triton 1%. A porcentagem da viabilidade das células infectadas foi normalizada através da comparação das absorbâncias com o controle negativo meio.

Notavelmente, muitos relatos sugerem que o comprometimento da proliferação e morte celular está associado à infecção por ZIKV (LI et al., 2016; TANG et al., 2016), enquanto outro relato sugere que ZIKV pobremente estimula a resposta imune e o efeito citopático em neuroprecursores humanos obtidos de tecido fetal. Esta falta de resposta imunológica forte permitiria que o ZIKV persistisse durante o desenvolvimento fetal e é consistente com a replicação observada ao longo de algumas semanas neste tecido (HANNERS et al., 2016). Essa diferença patogênica é evidenciada pela comparação das linhagens em que mostra o ZIKV asiático replicando em níveis menores, porém por longos períodos, enquanto o africano infecta mais células, replica com maior título e gera mais morte celular. Esses achados são consistentes com as manifestações clínicas associadas, em que o primeiro tem a habilidade de gerar infecções crônicas, permitindo a continuação do desenvolvimento fetal com malformações e o segundo, gera respostas patogênicas agudas, resultando na interrupção da gestação (SIMONIN et al., 2016).

Nestes experimentos, não foi possível observar diferenças significativas no efeito citopatogênico entre as duas linhagens. O baixo efeito citopático pode se relacionar aos baixos níveis de infecção observados neste tipo celular, como mostrado nos experimentos a seguir (Figura 16).

5.3. ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} não replicam de forma eficiente em BV2.

Com o objetivo de avaliar se a linhagem celular microglia-BV2 tem a capacidade de sustentar uma infecção produtiva, as células foram infectadas com os vírus ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}. A cinética de replicação viral intra e extracelular em BV2 foi avaliada por RT-qPCR, nos tempos de 0, 8, 16, 24, 48 e 96 horas p.i. (Figura 15 A-D). Visto o tardio aumento de cópias de RNA no sobrenadante, principalmente para o ZIKV_{MR766}, o ensaio de placa de lise foi feito com os sobrenadantes dos tempos de 0, 16, 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas p.i. (Figura 15 E-F).



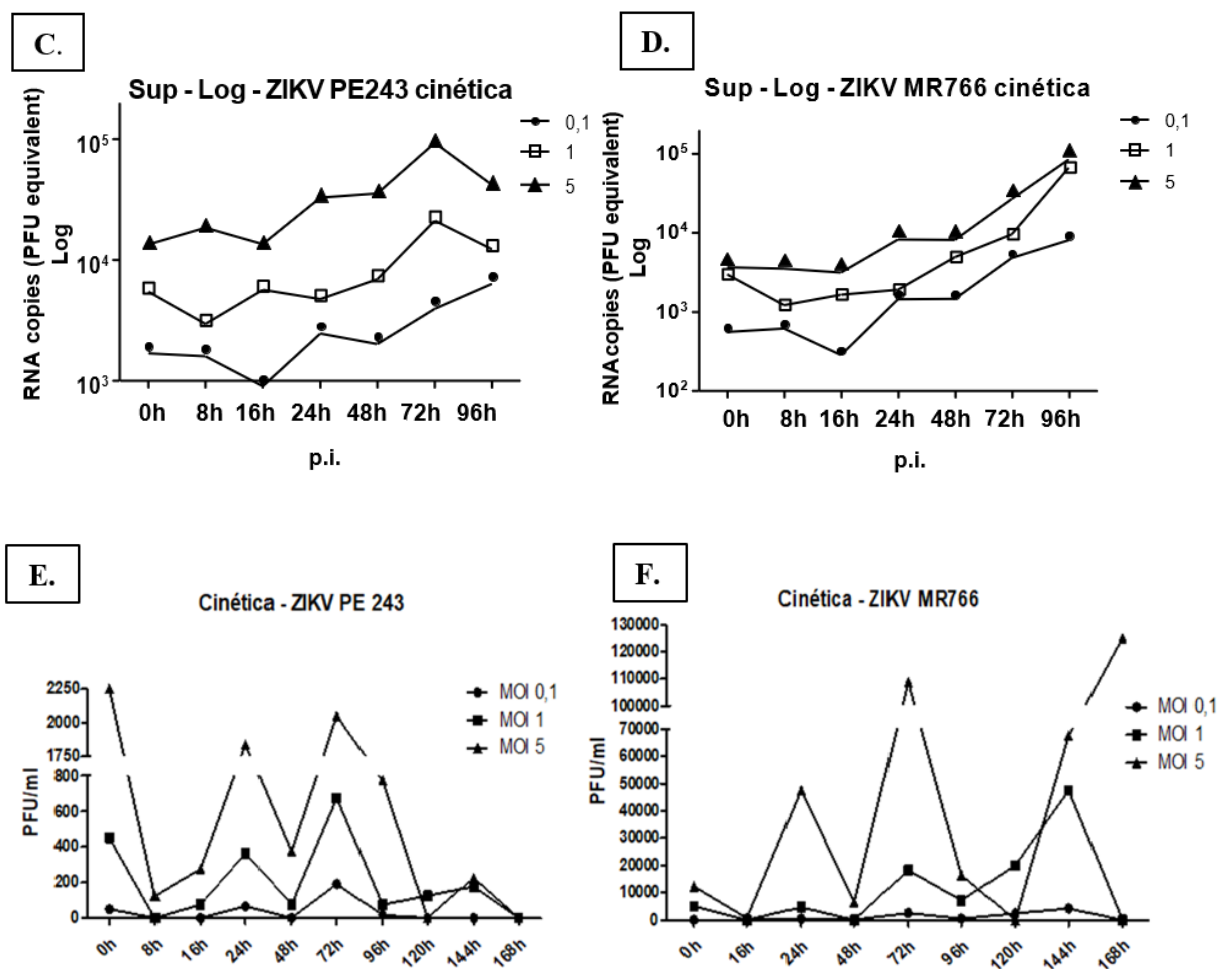


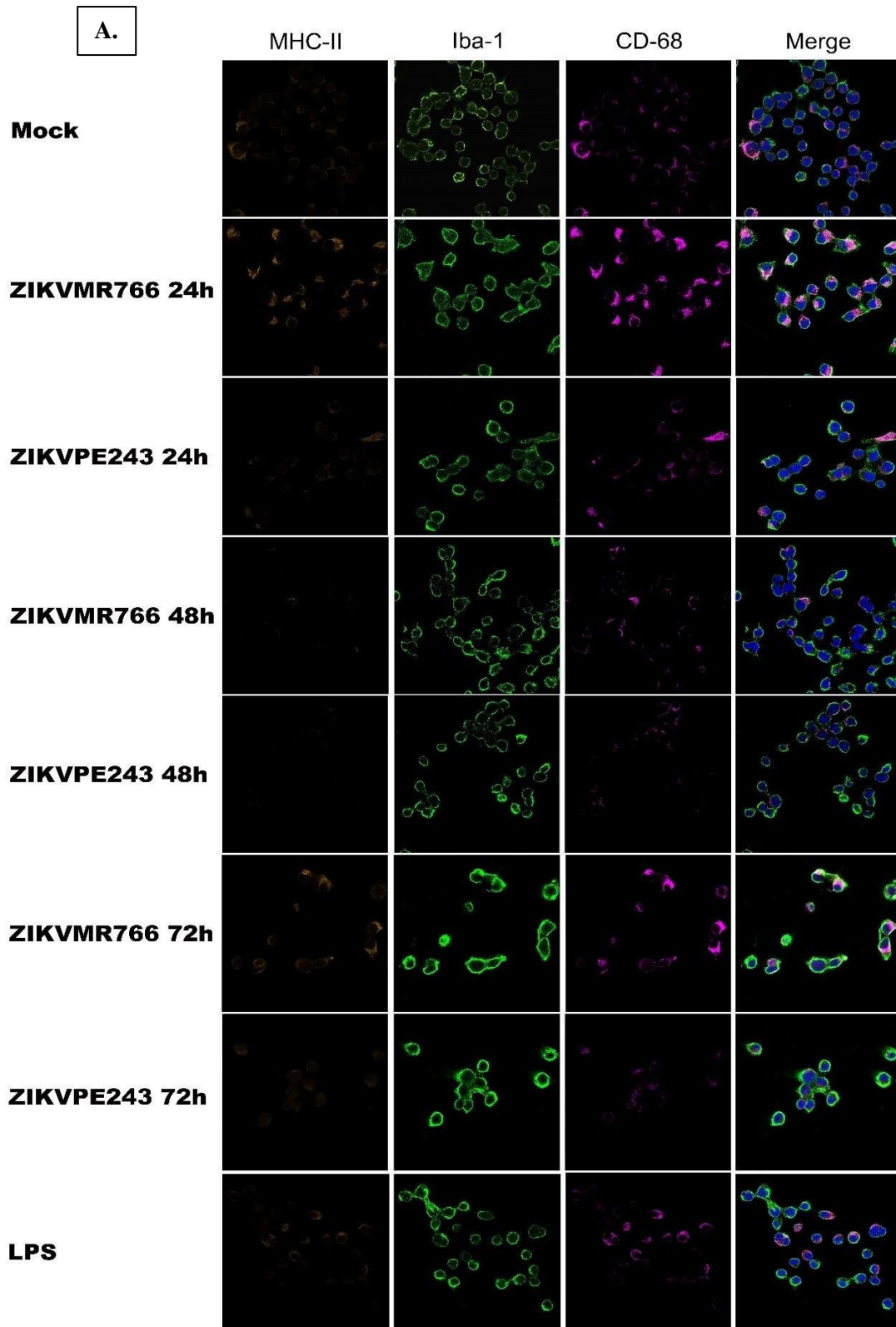
Figura 15. Cinética de avaliação da replicação do ZIKV em BV2. Células BV2 foram infectadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} em 3 MOIs distintos (0,1, 1 e 5). **A-D.** A cinética de replicação de ambos os isolados foi avaliada no pellet e no sobrenadante por RT-qPCR nos tempos de 0, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas p.i. Os resultados foram expressos em log da quantidade de cópias de RNA viral. **E-F.** A titulação das partículas infecciosas foi realizada em célula Vero com sobrenadante de BV2 dos tempos de 0, 8, 16, 24, 48, 72, 144 e 168h p.i., dadas em PFU/mL.

Os experimentos de cinética de replicação viral demonstram que as células BV2 são permissivas à infecção por ZIKV e são capazes de produzir partículas infecciosas. O RNA detectado no pellet indica que o vírus foi capaz de chegar ao espaço intracelular. Já o RNA no sobrenadante (sup) evidencia que há vírus sendo produzido e liberado da célula. Finalmente, o ensaio de PFU mostra que o vírus produzido é capaz de infectar outros tipos de células. Tanto os experimentos de qPCR, quanto os de PFU mostram uma liberação tardia de partículas virais, embora ambos os isolados apresentem picos de infectividade em 24 e 72h. Entretanto, é possível constatar que BV2 replica ZIKV_{PE243} de forma menos eficiente que ZIKV_{MR766}. Seria interessante investigar a possível causa da queda da infectividade em 48h, visto que não há queda também na produção de partículas virais no sobrenadante.

Os níveis de produção viral observados nestes experimentos foram menores (~2 logs) aos descritos por HBMECs de ambas as linhagens (PAPA et al., 2017). Os resultados também contrastaram com os de células-tronco neuronais e organoides cerebrais, que foram capazes de produzir altos títulos virais gerando, conseqüentemente, alta taxa de morte celular (SIMONIN et al., 2016). Outro estudo determinou se o estado hipoinmune de células progenitoras neurais humanas (hNPs) em resposta ao ZIKV impacta a replicação do vírus a longo prazo, monitorando a produção de vírus por 28 dias. Um aumento precoce foi detectado nos títulos virais 3 dias p.i., seguido por uma queda que coincide com o pico do efeito citopático. Os títulos atingiram o pico novamente no dia 7 e permaneceram até o dia 20, quando aumentaram ligeiramente durante o restante do tempo de 28 dias. Estes dados indicam que, após uma fase citotóxica inicial, o ZIKV estabelece uma infecção persistente neste modelo de cultura de hNPs (HANNERS et al., 2016). Com isso, pode-se sugerir que a micróglia seja um reservatório neural de liberação viral, ainda que pouca, e inflamação constante, uma vez que não há morte celular apesar da ativação, mostrada no experimento a seguir. Para confirmar essa hipótese, teria-se que estender novamente os tempos estudados para encontrar o pico de liberação viral, assim como relatado na literatura.

5.4. Ambos os isolados induzem a expressão de marcadores de ativação em células BV2.

Com o propósito de avaliar a possível ativação das células BV2 induzida por ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, a expressão das moléculas Iba1, MHC-II e CD68, típicos marcadores de ativação de micróglia, foram analisadas por imunocitoquímica (figura 16A). Adicionalmente, a expressão de CD68 também foi avaliada pela técnica de qPCR (Figura 16B). Para isto, as células BV2 foram infectadas por ambos os isolados com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i. e comparadas com o controle negativo “mock” e positivo “LPS”.



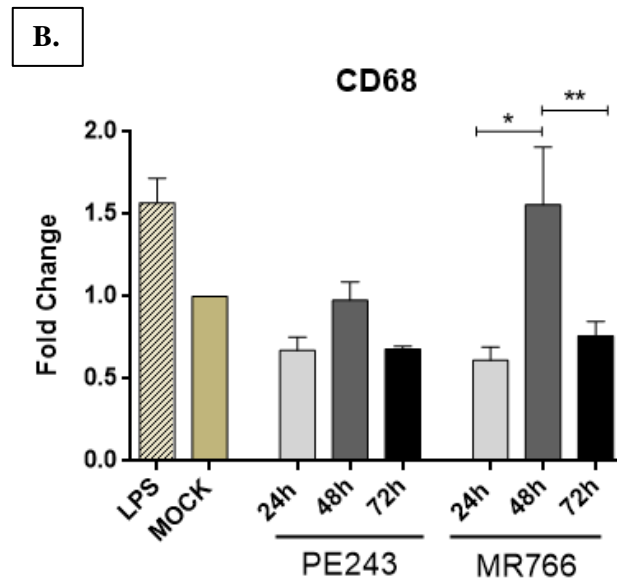


Figura 16. Avaliação da ativação das células BV2 induzida por ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, avaliadas a 24, 48 e 72 horas p.i. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS” para a imunocitoquímica e qPCR. **A.** BV2 infectada com ZIKVPE243 ou ZIKVMR766, marcada com anti-MHC II conjugado com PE (amarelo), anti-Iba1 com AlexaFluor488 (verde), anti-CD68 com AlexaFluor647 (rosa) e marcador de núcleos DAPI (azul). A microscopia de fluorescência foi realizada toda ao mesmo tempo, com as mesmas soluções de anticorpo e todas as fotos foram tiradas com os mesmos ajustes do microscópio confocal. **B.** qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene CD68. Os resultados plotados do $\Delta\Delta Ct$ foram normalizados em relação ao HPRT1 e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

Como pode ser observado na Figura 16A, ZIKV e LPS induzem, em células BV2, a expressão dos principais marcadores de ativação de micróglia (HENDRICKX et al., 2017). Entretanto, ZIKV_{MR766} parece aumentar mais a expressão desses marcadores em comparação ao ZIKV_{PE243}. Semi-quantitativamente, Iba1 parece ter o mesmo padrão de expressão em ambos os isolados e elevar os seus níveis de forma crescente com o tempo, enquanto MHC-II parece não ser induzida por ZIKV_{PE243}. O fato do isolado ZIKV_{MR766} ser mais infecciosa que ZIKV_{PE243} pode explicar o fato de ter mais moléculas apresentadoras de antígenos, MHC-II. Percebe-se, também, que a expressão das proteínas CD68 não acompanha a expressão de seu transcrito (Figura 16B). Embora o LPS sozinho não tenha efeito sobre o mRNA de CD68 em células BV2 (WONG et al., 2005), o tratamento com LPS e ATP teve um leve aumento não significativo em relação ao mock. Foi possível observar por qPCR uma modulação negativa na transcrição do marcador CD68 nas primeiras 24h e em 72h p.i., enquanto há modulação positiva da proteína nestes tempos na imunocitoquímica. Esta discrepância pode ser devida ao fato de que CD68 é

expresso principalmente nas membranas lisossomais intracelulares, mas também na membrana plasmática, e sofre regulação após um dado nível de expressão. Desta forma, é possível que estejamos detectando o momento de expressão da proteína e o feedback negativo da transcrição. Outro fato que poderia ser investigado é sobre a via de mTOR, que, quando ativada, faz com que a micróglia aumente a expressão de genes lisossomais (ZHAO et al., 2018). A indução da transcrição de CD68, por exemplo, poderia ser uma consequência direta da sinalização alterada de mTOR. Entretanto, as proteínas não estruturais do ZIKV, NS4A e NS4B, suprimem sinergicamente a via Akt-mTOR (Figura 9 da introdução), induzindo uma neurogênese defeituosa em NSCs fetais humanas (ROTHAN et al., 2019). Consequentemente, essa inibição pode atingir de alguma forma a expressão de CD68. Além de coincidir com os picos de infectividade do vírus (Figura 16 E-F), o que pode explicar a inicial ativação das células e a expressão elevada de CD68 na imunocitoquímica, seguida da inibição da transcrição do gene lisossomal pelo ZIKV em 24h, com a consequente queda da expressão da proteína em 48h. A baixa infectividade do vírus em 48h pode ter feito com que os níveis de transcrição de CD68 voltem a aumentar, significativamente em relação aos outros tempos no caso da infecção pelo ZIKV_{MR766}, e o resultado disso pode ser observado com o aumento da tradução em 72h. O outro pico de infectividade viral em 72h se correlaciona, novamente, com a regulação negativa da transcrição de CD68 neste mesmo tempo.

5.5. A infecção altera a expressão de PPAR γ e mediadores inflamatórios em células BV2

Com o objetivo de avaliar se a infecção pelo ZIKV altera a expressão de PPAR α e γ , as células BV2 foram infectadas com os isolados ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766}, e após 12, 24, 48 e 72 horas, foram extraídos os mRNAs, e os respectivos cDNAs sintetizados. Como controles negativos foram utilizadas células tratadas com LPS, e células não infectadas -mock-. Já como controle positivo foram utilizadas células de adipócito murino provenientes de camundongo C57/Bl6, que expressam altos níveis de PPAR γ . Num primeiro momento, os níveis de expressão de PPAR γ foram avaliados por qPCR. Os resultados mostraram um claro aumento da expressão de PPAR γ tempo-dependente, observando-se um aumento maior em células infectadas pelo isolado brasileiro, apresentando diferenças estatisticamente significativas nos tempos de 24 e 48 horas p.i., enquanto o isolado africano apresentou um aumento significativo, semelhante ao induzido pelo isolado brasileiro, apenas no tempo de 72 horas p.i. (figura 17). Levando em consideração que no tempo de 48 horas p.i. foi possível observar um elevado nível de expressão

e uma diferença estatisticamente significativa entre ambos os isolados, este foi escolhido para os experimentos de infecção com posterior tratamento com agonista e/ou antagonista de PPAR γ .

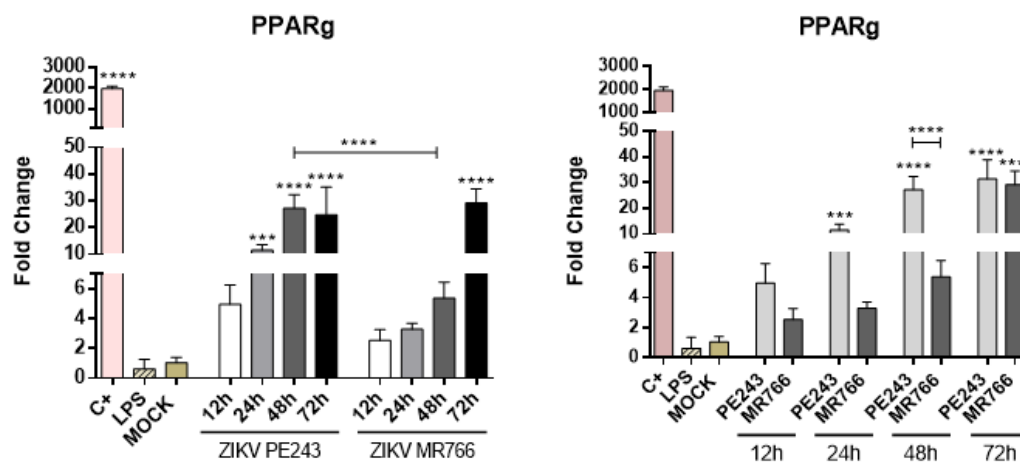


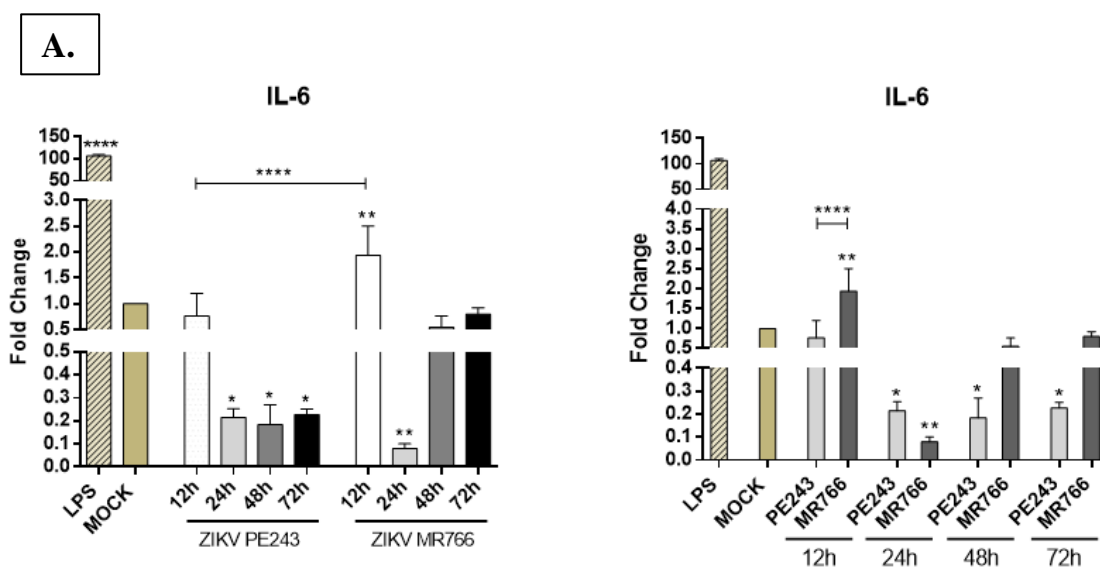
Figura 17. Alteração da expressão do PPAR γ em células BV2 pela infecção do ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, avaliadas a 12, 24, 48 e 72 horas p.i. O controle negativo é o “LPS”, “mock” é o controle sem infecção, e o controle positivo é proveniente de adipócitos murinos, sendo representado por “C+”. qPCR dos níveis de cópias de mRNA de PPAR γ . Os resultados plotados do $\Delta\Delta Ct$ foram normalizados em relação à β -actina e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ como diferença significativa, em relação ao mock quando não identificado pela barra.

Da mesma forma, foram avaliados os níveis de expressão de PPAR α nas células BV2 infectadas por ambas as linhagens de ZIKV. Não entanto, não foi possível detectar indução da expressão deste receptor nuclear nas células infectadas e não infectas (dados não mostrados). Estes resultados se contrapõem aos descritos por Tyagi e colaboradores, que descrevem a expressão desta isoforma em células da glia (TYAGI et al., 2011). Isso pode se dever ao fato de que as três isoformas apresentam padrões específicos de localização no cérebro e medula espinhal (MORENO; FARIOLI-VECCHIOLI; CERÙ, 2004). Além disso, Kummer e colaboradores já demonstraram que, apesar da microglia expressar tanto a isoformas α , como a γ , esta última é mais expressa em astrócitos, enquanto a primeira é mais expressa na microglia (KUMMER; HENEKA, 2008).

É importante destacar que estes resultados, mostraram pela primeira vez a indução da expressão de PPAR γ como consequência da infecção pelo ZIKV. Por outro lado, as marcadas diferenças observadas nos níveis de expressão entre ambas linhagens do ZIKV, sugerem a indução diferencial de mecanismos anti-inflamatórios e/ou antivirais nas células infectadas pelos isolados africano e brasileiro. Uma via possivelmente relacionada à regulação diferencial

de PPAR γ por ambos os isolados poderia ser a via mTOR, já que diversos trabalhos já mostraram que a via mTOR está relacionada com a indução da expressão de PPAR γ (THELEN; ZONCU, 2017; VASHEGHANI et al., 2015). Além disso, já foi mostrado que as proteínas não estruturais NS2a e NS2b de ZIKV são capazes de inibir a sinalização da via mTOR, com o intuito de evadir a resposta antiviral e de favorecer sua replicação (LIANG et al., 2016). Estes achados sugerem a possibilidade de que a regulação diferencial desta via, pelos isolados brasileiro e africano, possa participar da regulação de PPAR γ . Sendo assim, uma maior capacidade do isolado africano de inibir a via mTOR poderia explicar sua maior replicação viral e expressão de marcadores de ativação, assim como os menores níveis de PPAR γ observados na infecção pelo isolado ZIKV_{MR766}. Porém, mais experimentos são necessários para confirmar esta hipótese.

Em seguida, com o intuito de avaliar se o aumento de PPAR γ teve impacto na expressão de citocinas, analisou-se a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 18).



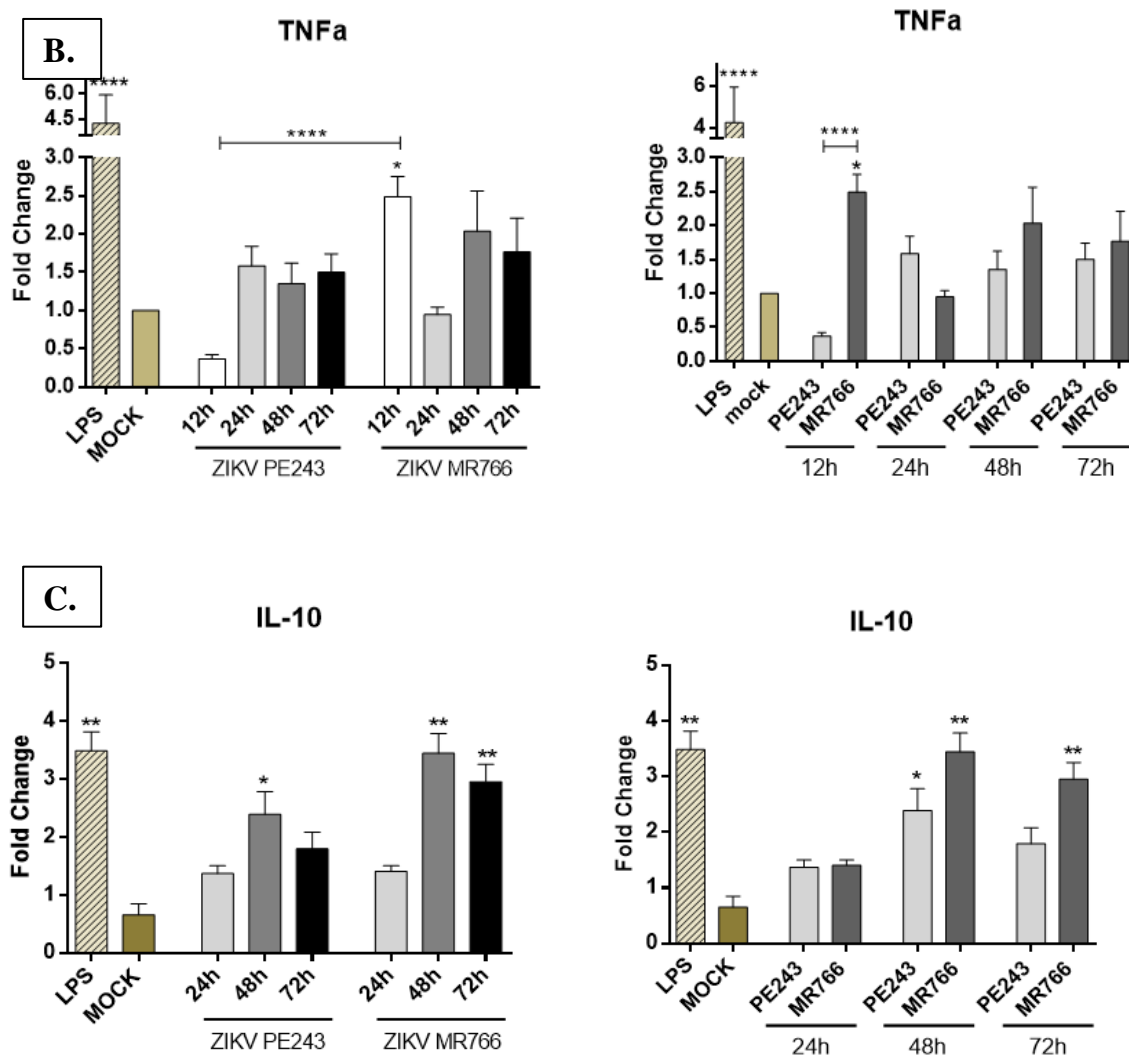


Figura 18. Alteração da expressão de citocinas em células BV2 pela infecção do ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, avaliadas a 12, 24, 48 e 72 horas p.i., exceto para a IL-10, que não foi analisada no tempo de 12 horas p.i. O controle negativo é “mock” e o positivo, “LPS”. A. qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene IL-6. B. qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene TNF- α . C. qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene IL-10. Os resultados plotados do $\Delta\Delta C_t$ foram normalizados em relação ao GAPDH e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

De forma geral, os níveis de expressão da IL-6 se mostraram inferiores aos apresentados pelas células não infectadas. Entretanto, no tempo 12 horas p.i., as células infectadas com o isolado africano, mostraram um nível de expressão maior do que as células não infectadas e do que as infectadas pelo isolado ZIKVPE243. Por outro lado, as células infectadas pelo isolado brasileiro, mostraram níveis inferiores aos das células infectadas pelo isolado africano em todos os tempos, exceto 24 horas p.i., no qual o isolado africano apresentou uma abrupta queda (figura 18).

Diferente do que foi observado com a IL-6, os níveis de expressão de TNF- α apresentaram, de forma geral, um discreto aumento em relação ao mock, sendo que os níveis induzidos pelo isolado africano foram maiores do que os apresentados pelo isolado brasileiro nos tempos de 12, 48 e 72 horas p.i., observando-se um aumento significativo desta citocina no tempo de 12 horas p.i, com diferença estatisticamente significativa em relação às células infectadas com o isolado brasileiro, nas quais estava aparentemente regulado negativamente (figura 18). Novamente, no tempo de 24 horas p.i., foi possível observar menores níveis desta citocina em células infectadas pelo isolado africano, apesar da ausência de diferença estatística.

Ao analisar o padrão de expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, é possível observar um aumento muito significativo após tratamento com LPS. Da mesma forma, foi possível observar uma maior expressão desta citocina nas células infectadas, em comparação com as células não infectadas, estando significativamente aumentada na infecção pelo isolado MR766 nos tempos de 48 e 72 horas p.i., o qual se correlacionaria com o começo de uma resposta anti-inflamatória (Figura 18). Na infecção causada pelo isolado PE243, os níveis de IL-10 apresentaram aumento significativo apenas no tempo de 48 horas p.i., sendo menos significativo do que o aumento induzido pelo isolado africano.

Os elevados níveis de expressão de PPAR γ nas células infectadas pelo ZIKV, assim como a redução dos níveis de expressão da citocina inflamatória IL-6 sugerem a ativação de um mecanismo inibitório da resposta inflamatória por parte do ZIKV. Por outro lado, os níveis de TNF- α , embora aumentados em comparação ao mock, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, exceto pelo induzido pelo isolado africano 12 horas p.i., sugerindo também a possível indução de um mecanismo anti-inflamatório por parte do ZIKV. É importante salientar que a infecção das células BV2 com o isolado brasileiro induziu maiores níveis de expressão de PPAR γ , e menores níveis das citocinas inflamatórias, quando comparados aos induzidos pelo isolado africano. Estas diferenças observadas entre os isolados poderiam explicar, ao menos em parte, o menor efeito patogênico e capacidade replicativa apresentado pelo isolado brasileiro (SIMONIN et al., 2016). O que por sua vez, poderia ser um fator decisivo no desenvolvimento da síndrome congênita induzida por este isolado.

Chama atenção a falta de correlação dos níveis destas citocinas inflamatórias com os de PPAR γ induzidos pelas duas linhagens de ZIKV no tempo de 24 horas p.i., onde é possível observar uma abrupta queda em células infectadas pela linhagem africana, inferiores aos apresentados por células infectadas pela linhagem brasileira. Isto poderia sugerir a participação

de outro mecanismo regulatório específico, neste tempo de infecção, ainda não conhecido, induzido apenas pela linhagem africana.

É importante destacar o importante papel da microglia na neuroinflamação e no metabolismo lipídico durante a infecção pelo ZIKV. Foi demonstrado que a síntese de metabólitos lipídicos por essas células pode contribuir para a produção de citocinas pró-inflamatórias, que desempenham um papel crucial na neuroinflamação induzida pelo ZIKV (DIOP et al., 2018). Van der Poel e colaboradores mostraram que a microglia apresenta níveis aumentados de genes envolvidos no metabolismo lipídico, dentre eles PPAR γ , em um modelo murino de Esclerose Múltipla (VAN DER POEL et al., 2019).

Queiroz e colaboradores observaram níveis aumentados de várias espécies lipídicas de fosfatidiletanolamina no soro de pacientes com ZIKV, em sua maioria plasmalogênios ligados a ácidos graxos poli-insaturados, que são particularmente enriquecidos nas membranas neurais do cérebro. A biossíntese de plasmalogênios requer peroxissomos funcionais, locais importantes para replicação viral, incluindo o ZIKV. Sendo assim, os níveis aumentados destes fosfolipídeos no soro de indivíduos infectados com ZIKV poderiam estar relacionados à indução da expressão de PPAR γ observada em nosso estudo. Estes dados fornecem informações importantes sobre lipídios celulares específicos que provavelmente estão associados à replicação do ZIKV, podendo servir como plataforma para estratégia antiviral contra o ZIKV (QUEIROZ et al., 2019).

5.6. O tratamento com Rosiglitazona reduziu os níveis de citocinas inflamatórias em células BV2 infectadas

Visando investigar mais profundamente o papel de PPAR γ na resposta inflamatória induzida pelo ZIKV, as células BV2 foram infectadas com os isolados ZIKVPE243 e ZIKVMR766 e imediatamente tratados com Rosiglitazona, um fármaco agonista de PPAR γ , nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M, e 48 horas p.i. os mRNAs foram extraídos. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas com LPS, o mock representa o controle não infectado, porém tratado com agonista (M+Rosi), e como controle positivo foram utilizadas células de adipócito murino provenientes de camundongo C57/B16, como mencionado anteriormente. Desta forma foi possível observar que o tratamento com agonista levou à uma diminuição significativa nos níveis de ambos os mediadores inflamatórios, em todas as concentrações analisadas, quando comparados aos níveis destas citocinas presentes nas células

infectadas não tratadas com agonista (Figura 19).

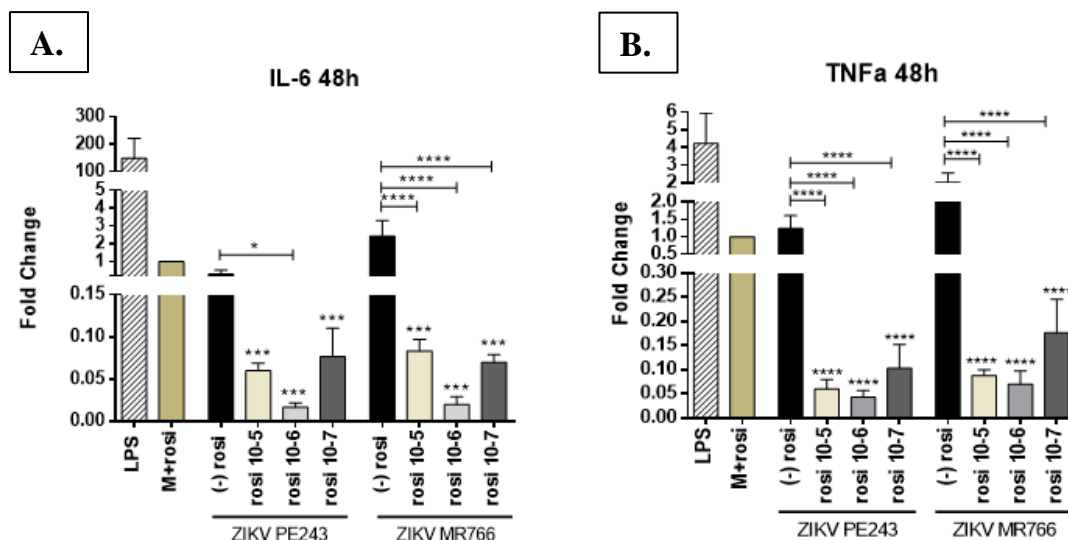


Figura 19. Alteração da expressão de citocinas em células BV2 após infecção pelo ZIKV, seguida de tratamento com Rosiglitazona. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, tratadas com Rosiglitazona e avaliadas 48 horas p.i. O controle negativo é representado pelo tratamento com agonista e sem infecção (M+Rosi), e o positivo, “LPS”. **A.** qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene IL-6. **B.** qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene TNF- α . Os resultados plotados do $\Delta\Delta C_t$ foram normalizados em relação ao GAPDH e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

Estes resultados confirmaram estudos anteriores quanto ao papel neuroprotetor induzido por TZDs, através da inibição da ativação microglial e da expressão de quimicocinas e citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, atenuando a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios no SNC (KAPADIA, 2008). Observa-se ainda que, de modo geral, os níveis de TNF- α foram maiores que os de IL-6, padrão observado também pela infecção sem tratamento com agonista. Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de inibição nas concentrações testadas, a concentração 10^{-6} M apresentou maiores níveis de inibição, o que levou à escolha desta concentração para a realização do experimento posterior, no qual as BV2 foram infectadas com ambos os isolados, e tratadas com antagonista e/ou agonista de PPAR γ (experimentos em andamento).

5.7. A infecção altera a expressão do miR-124 em células BV2

Com o objetivo de obter um melhor entendimento dos mecanismos imunorregulatórios exercidos por PPAR γ na infecção pelo ZIKV, foram avaliados os níveis do miR-124, alvo de PPAR γ e inibidor da expressão de vários genes inflamatórios, como TRAF6, IL-6 e TNF- α , tanto *in vitro* como *in vivo* (WANG et al., 2017).

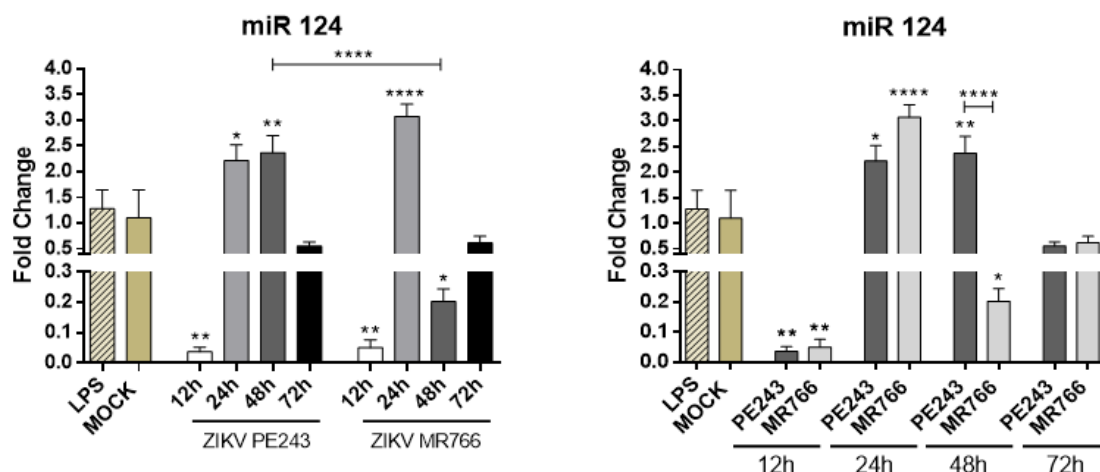


Figura 20. Alteração da expressão do miR-124 em células BV2 após infecção pelo ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, e avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas p.i. O controle negativo é representado como mock, e o positivo, “LPS”. qPCR dos níveis de cópias do miRNA-124. Os resultados do $\Delta\Delta C_t$ foram normalizados em relação ao U6 e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

De forma geral, o aumento da expressão do miR-124 induzidos pelo isolado brasileiro nos tempos de 24 e 48 horas p.i., se correlacionam de forma direta com os níveis de PPAR γ , já que este miRNA é regulado positivamente pelo PPAR γ (WANG et al., 2017). Já a infecção pelo isolado africano induziu aumento apenas no tempo de 24 horas p.i., apresentando uma queda abrupta 48 horas p.i. Curiosamente, no tempo de 24 horas p.i., a infecção causada pelo isolado africano apresentou um aumento mais pronunciado que a infecção pelo isolado brasileiro, porém no tempo de 48 horas p.i. essa relação se inverte de forma significativa, onde a expressão induzida pelo isolado africano diminui a níveis inferiores ao apresentado por células não infectadas (Figura 20). Este achado poderia explicar os menores níveis de IL-6 e TNF- α observados nas células infectadas pelo isolado africano, em comparação aos apresentados por células infectadas pelo isolado brasileiro no tempo de 24 horas p.i. Entretanto, o mecanismo responsável por este fenômeno requer maior investigação. Já os maiores níveis do miR-124 apresentados por células infectadas pela linhagem brasileira nos tempos de 24 e 48 horas p.i. se

correlacionam com os menores níveis das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α nestes tempos. Os baixos níveis de expressão deste miR no tempo de 12 horas p.i., e o aumento nos tempos de 24 e 48 horas p.i., estão de acordo com a literatura, que mostra que este miR, assim como o miR-146a, estão negativamente regulados no estágio inicial da resposta imune, aumentando durante o estágio de transição para a resolução da inflamação (SU; ALOI; GARDEN, 2016).

5.8. A infecção altera a expressão do miR-146a em células BV2

De forma geral ambos isolados levaram a um aumento da expressão deste miRNA. Entretanto, o isolado africano se mostrou mais eficiente em todos os tempos, observando-se diferenças estatisticamente significativas entre os isolados nos tempos de 24, 48 e 72 horas p.i (Figura 21). É importante ressaltar que os níveis de expressão deste miRNA se correlacionam inversamente com os níveis de PPAR γ observados, o que está de acordo com achados, que mostram que o aumento deste miRNA resulta na diminuição da expressão do coativador-4 de receptor nuclear (NCOA4) que, por sua vez, é um conhecido ativador de PPAR γ (VILADOMIU et al., 2012). Além disso, os níveis aumentados deste miRNA se correlacionam também com a regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias, e a regulação positiva da IL-10, principalmente nos tempos de 24 e 48 horas p.i. (Figura 19).

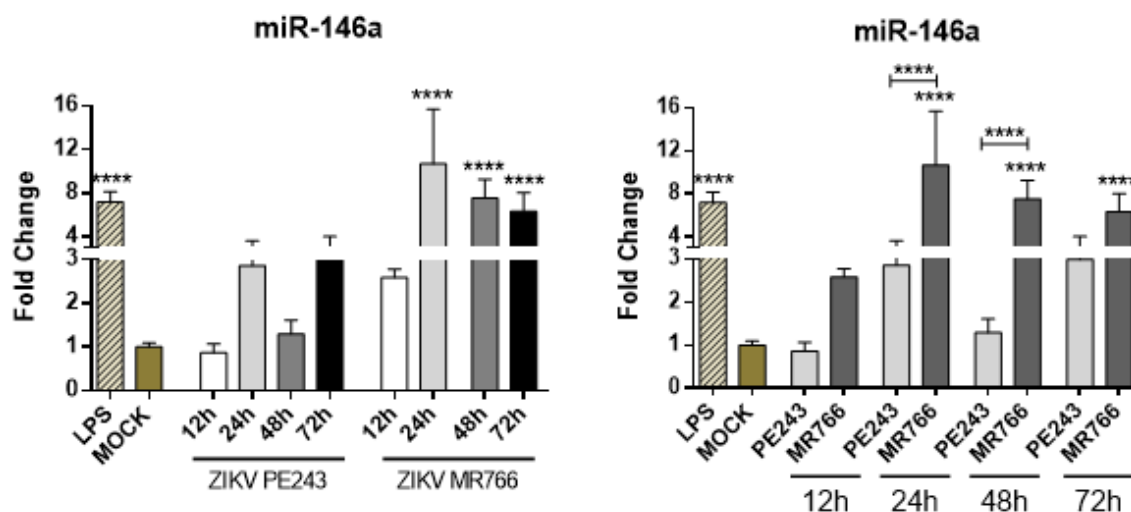


Figura 21. Alteração da expressão do miR-146a em células BV2 após infecção pelo ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, e avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas p.i. O controle negativo é representado como mock, e o positivo, “LPS”. qPCR dos níveis de cópias do miR-146a. Os resultados do $\Delta\Delta Ct$ foram normalizados em relação ao U6 e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

5.9. A infecção altera a expressão da proteína TRAF6 em células BV2

Ao analisar a expressão de TRAF6, alvo dos miRNAs 124 e 146a, foi possível observar um aumento significativo desta proteína no tempo de 12 horas p.i. induzido por ambos os isolados, seguido de uma redução nos tempos subsequentes (Figura 22). Nos tempos de 24, 48 e 72 horas p.i., as células infectadas pelo isolado africano apresentaram níveis aparentemente inferiores aos induzidos pelo isolado brasileiro, apesar de não atingirem diferenças estatisticamente significativas em relação ao mock. De forma geral, os níveis de TRAF6 mostraram uma relação inversamente proporcional aos do miR-146a, o que já era esperado, já que este miRNA inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias através da supressão da expressão de IRAK1 e TRAF6 (WEI et al., 2016). Da mesma forma, os níveis de expressão desta proteína em comparação aos os do miR-124, pode-se observar uma correlação inversa nos tempos de 12 e 24 horas p.i. Porém, nos tempos de 48 e 72 horas p.i., os dados não mais se correlacionam, o que poderia ser devido a participação de outros mecanismos regulatórios em tempos mais tardios de infecção, inclusive por outros miRNAs, como por exemplo o miR-125, que atua na fase mais tardia da resposta imune, e que também tem como alvo a proteína TRAF6 (CEPPI et al., 2009).

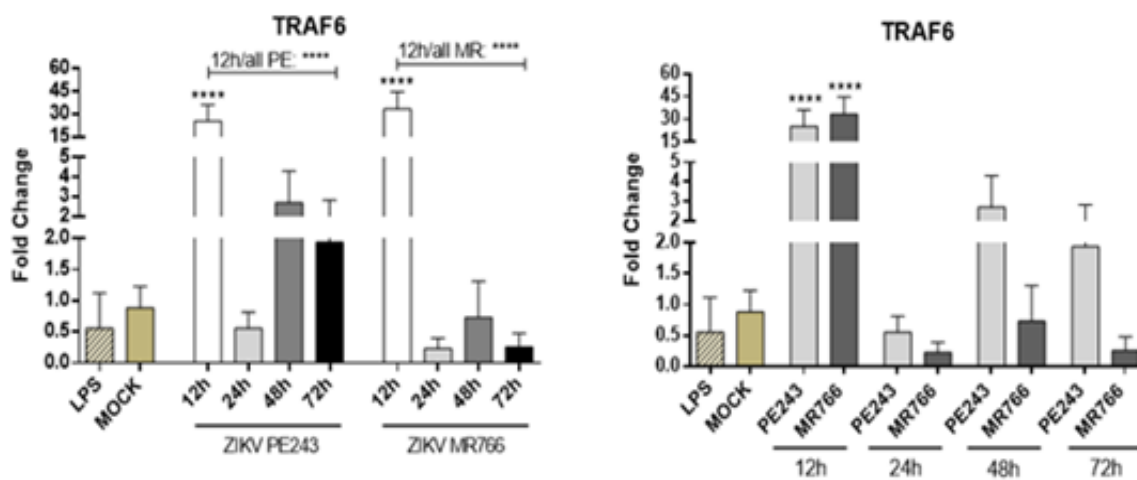


Figura 22. Alteração da expressão de TRAF6, alvo dos miRNAs 124 e 146a, em células BV2 após infecção pelo ZIKV. Células BV2 foram infectadas por ZIKVPE243 ou ZIKVMR766 com MOI 1, e avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas p.i. O controle negativo é representado como mock, e o positivo, “LPS”. qPCR dos níveis de cópias de mRNA do gene TRAF6. Os resultados do $\Delta\Delta Ct$ do mRNA foram normalizados em relação ao GAPDH e ao mock. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA, considerando $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ como diferença significativa em relação a amostra identificada pela barra.

Ao analisar os níveis de TRAF6 em comparação aos das citocinas pró-inflamatórias, nota-se uma correlação nos tempos de 12 e 24 horas p.i. deste proteína com IL-6 e TNF- α , inclusive justificando a diminuição abrupta nos níveis destas citocinas no tempo de 24 horas p.i., por parte do isolado ZIKV_{MR766}. No entanto, nos tempos de 48 e 72 horas p.i., essa correlação é perdida. TRAF6 é uma proteína adaptadora importante nas respostas antivirais envolvendo a via de sinalização do NF- κ B e, conseqüente, a produção de IFN- β e IL-6. O papel desta proteína na produção destas citocinas ficou comprovado por meio de experimentos envolvendo seu nocaute e sua superexpressão (LV et al., 2017). Por outro lado, o papel desta proteína na resposta antiviral foi demonstrado quando a superexpressão da mesma inibiu significativamente a replicação do vírus da peste suína clássica (CSFV), enquanto seu nocaute restaurou a replicação do CSFV em macrófagos alveolares porcinos. Além disso, TRAF6 foi degradada durante a infecção por CSFV, indicando que a degradação do TRAF6 poderia contribuir para a replicação persistente do CSFV (LV et al., 2017).

Os menores níveis de expressão de TRAF6 nos tempos de 24, 48 e 72 horas p.i. observados na infecção, principalmente pelo isolado africano, sugerem uma possível ativação de um mecanismo inibitório da expressão desta importante proteína logo após a infecção. Os maiores níveis de expressão de TRAF6 apresentados por células infectadas pelo isolado ZIKV PE243, em comparação aos níveis apresentados pelas células infectadas pelo isolado MR766, poderiam indicar uma certa deficiência da linhagem brasileira de inibir esta via de sinalização antiviral, a que poderia ser responsável pela sua menor patogenicidade.

6. Conclusão

A partir dos experimentos de viabilidade celular e cinética de replicação viral, podemos concluir que a infecção por ZIKV não é capaz de induzir efeitos citopatogênicos em células da micróglia BV2, apesar destas células se mostrarem permissivas à infecção por ZIKV e capazes de produzir partículas virais infecciosas. Curiosamente, os níveis de infectividade e replicação viral induzidos por ambos os isolados em células BV2 são menores que os descritos para outros tipos celulares, como HBMECs (PAPA et al., 2017). Adicionalmente, foi investigada a expressão de marcadores de ativação, como Iba1, CD68 e MHC-II, através da imunocitoquímica, que mostrou que ambos os isolados, ZIKV_{MR766} e ZIKV_{PE243}, induzem a expressão dos marcadores de ativação. Além disso, o isolado africano foi capaz de induzir uma maior ativação, o que pode ser explicado pelo fato deste isolado induzir respostas mais agudas que o isolado brasileiro (SIMONIN et al., 2016). Com isso, pode-se sugerir que a micróglia seja um reservatório neural de liberação viral, ainda que pouca, e inflamação constante, uma vez que não há morte celular apesar da ativação.

Observou-se, ainda, que o isolado ZIKV_{PE243} foi capaz de induzir maiores níveis de PPAR γ e menores níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, em comparação ao isolado ZIKV_{MR766}. No entanto, PPAR α não apresentou expressão neste tipo celular. Além disso, as células infectadas e tratadas com Rosiglitazona, um agonista de PPAR γ , apresentaram redução significativa da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , evidenciando a participação do PPAR γ na regulação da expressão destas citocinas. É importante destacar que os níveis de PPAR γ induzidos pelo isolado africano no tempo de 24 horas p.i., não coincidem com a redução significativa das citocinas pró-inflamatórias observada neste tempo. Ainda, de modo geral, os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 parecem se correlacionar com os níveis de PPAR γ , como esperado, já que PPAR está relacionado com a indução de vias anti-inflamatórias, como a que culmina na produção de IL-10 e TGF- β , ao passo que inibe vias pró-inflamatórias, como por exemplo a via NF- κ B (LIU et al., 2014). Porém, foram observadas discrepâncias nesta relação, já que o isolado brasileiro, que apresentou maiores níveis de PPAR γ , apresentou menores níveis de IL-10, quando comparados ao isolado africano.

Buscando por outros mediadores inflamatórios que possam estar envolvidos na regulação da resposta inflamatória observada, foram investigados os miRNAs 124 e 146a, que estão envolvidos na inibição de vias pró-inflamatórias, e possuem relação direta com PPAR γ (SUN

et al., 2013; WEI et al., 2016). Desta forma, foi observado que os níveis do miR-124 induzidos pelo isolado brasileiro se correlacionam de forma direta e com os de PPAR γ nos tempos de 12, 24 e 48 horas p.i. Já o miR-146a se correlacionou negativamente com PPAR γ e com as citocinas inflamatórias, e positivamente com os de IL-10, principalmente nos tempos de 24 e 48 horas p.i. Buscando investigar mais sobre a possível modulação da resposta inflamatória por parte destes miRNAs, analisou-se também os níveis da proteína adaptadora da via NF-KB, TRAF6, que é alvo de ambos os miRNAs deste estudo (QIU et al., 2015; WEI et al., 2016). De forma geral, os níveis de TRAF6 se correlacionaram com os dos miRNAs analisados. Além disso, o evidente aumento destes miRNAs induzido pelo isolado africano no tempo de 24 horas p.i. coincide com a redução de TRAF6 observada, o que poderia explicar a abrupta redução nos níveis das citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo isolado ZIKV_{MR766} neste tempo, que não apresentavam correlação com os níveis de PPAR γ observados.

O diferencial aumento da expressão do receptor nuclear PPAR γ em células BV2 induzido pela infecção com os isolados PE243 e MR766 do ZIKV, pode ter um papel relevante na biogênese de peroxissomos, metabolismo de lipídeos e na resposta antiviral mediante a regulação da produção de citocinas antivirais e pro-inflamatórias. Finalmente, acreditamos que as diferenças observadas poderiam explicar, ao menos em parte, as claras diferenças na virulência, tropismo tecidual, patologia, e evasão imune apresentados por ambos os isolados.

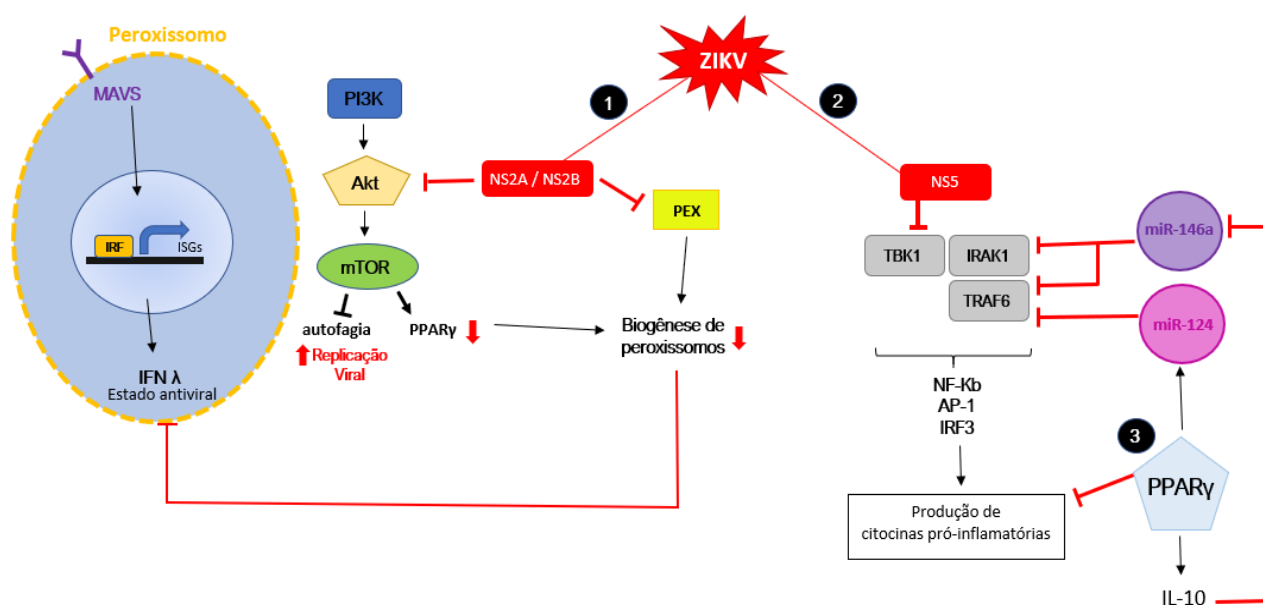


Figura 23. Esquema geral da modulação de vias pelo Vírus Zika. (1) Como os vírus envelopados não possuem mecanismos para executar sua própria síntese lipídica, precisam cooptar enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, orquestrando reajustes profundos no metabolismo lipídico da célula hospedeira. Através da inibição da biogênese de peroxissomos, os vírus envelopados são capazes de evadir à resposta por IFN-III, além de alterar a morfologia e o perfil lipídico celulares, afim de apoiar

sua replicação. A via mTOR está relacionada, dentre outras coisas, com a homeostase lipídica e a inibição da autofagia, sendo capaz de induzir PPAR γ . A inibição desta via por parte das proteínas NS2A e NS2B de ZIKV induz a autofagia, gerando ATP para apoiar a replicação viral. (2) A proteína NS5 de ZIKV é capaz de inibir a proteína TBK1, suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, com a finalidade de evasão da resposta imune inata. (3) PPAR γ é um importante regulador da resposta inflamatória, induzindo a fenótipo M2 da microglia, induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e inibindo as vias pró-inflamatórias. Os miRNAs 124 e 146a possuem ação anti-inflamatória, inibindo a sinalização de vias pro-inflamatórias, como a NF- κ B, AP-1 e IRF3. O miR-124 é induzido diretamente por PPAR γ . Já o miR-146, induzido pela IL-10, causa uma inibição de NCOA4, um conhecido ativador de PPAR γ . Abreviações: IRF (fator regulador de IFN); ISGs (genes estimulados por IFN); PEX (peroxina). **Autoria própria.**

7. Próximos passos

- ✓ Quantificar os níveis de transcrição de TNF- α e IL-6, por qPCR, das amostras extraídas de BV2 infectadas e tratadas com antagonista sozinho, ou acompanhado de agonista;
- ✓ Confirmar a expressão de PPAR γ , TNF- α e IL-6 por Imunoblotting;
- ✓ Quantificar a infecção de ZIKV através da cinética de replicação viral, em todas as condições de tratamento (agonista / antagonista+agonista / antagonista), para avaliar o possível impacto de PPAR na replicação viral.

8. Perspectivas

- ✓ Elucidar a relevância fisiológica da ativação da expressão de PPAR γ nos mecanismos anti-inflamatórios e replicação viral em células BV2 infectadas pelas linhagens africana e brasileira.

9. Referências Bibliográficas

- ADAMS WALDORF, K. M. et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. **Nature Medicine**, 2018.
- AGRATI, C. et al. Activated V gamma 9V delta 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release. **J Immunol**, 2009.
- AGRATI, C. et al. Longitudinal characterization of dysfunctional T cell-activation during human acute Ebola infection. **Cell Death and Disease**, 2016.
- ALEXOPOULOU, L.; DESNUES, B.; DEMARIA, O. [Toll-like receptor 8: the awkward TLR]. **Médecine sciences : M/S**, 2012.
- ALIOTA, M. T. et al. Heterologous Protection against Asian Zika Virus Challenge in Rhesus Macaques. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.
- ALLONSO, D. et al. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. **Journal of Virology**, 2015.
- ALVAREZ-GARCIA, I. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development**, 2005.
- ALVAREZ, J. I.; KATAYAMA, T.; PRAT, A. Glial influence on the blood brain barrier. **GLIA**, 2013.
- ARGAW, A. T. et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. **Journal of Clinical Investigation**, 2012.
- ASHRAF, U. et al. MicroRNA-19b-3p Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF11. **Journal of Virology**, v. 90, n. 9, p. 4780–4795, 2016.
- ASIF, A. et al. Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. **Viral immunology**, 2017.
- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of Disease**, 2004.
- BARBALAT, R. et al. Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. **Annual Review of Immunology**, 2011.
- BARONTI, C. et al. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia Outbreak in 2013. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 2013–2014, 2014.
- BARTEL, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.
- BARTON, G. M.; KAGAN, J. C. A cell biological view of toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. **Nature Reviews Immunology**, 2009.
- BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 2016.
- BEARCROFT, W. G. C. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1956.

BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. **MicroRNAs: Novel regulators during the immune response***Journal of Cellular Physiology*, 2009.

BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 3–18, 2013.

BOIGARD, H. et al. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2017.

BOLLINGER, C. R.; TEICHGRÄBER, V.; GULBINS, E. **Ceramide-enriched membrane domains***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2005.

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

BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, 2017.

BRINTON, M. A.; BASU, M. Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. **Virus Research**, v. 206, p. 108–119, 2015.

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

BROWN, G. C.; VILALTA, A. How microglia kill neurons. **Brain Research**, 2015.

BRUGNARO, P. et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 10, p. 1–5, 2016.

CABALLERO-GARRIDO, E. et al. In Vivo Inhibition of miR-155 Promotes Recovery after Experimental Mouse Stroke. **Journal of Neuroscience**, 2015.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, 2018.

CALDEIRA, C. et al. Microglia change from a reactive to an age-like phenotype with the time in culture. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2014.

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

CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**. 4th. ed. University of Leicester, UK: Elsevier Academic Press, 2005.

CAO-LORMEAU, V. M. **RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013***Emerging Infectious Diseases*, 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**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CARDOSO, A. L. et al. miR-155 modulates microglia-mediated immune response by down-

- regulating SOCS-1 and promoting cytokine and nitric oxide production. **Immunology**, v. 135, n. 1, p. 73–88, 2012.
- CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal of Medicine**, 2016.
- CASTILLO RAMIREZ, J. A.; URCUQUI-INCHIMA, S. Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 6, p. 421–430, 2015.
- CDC. Arbovirus Catalog - Zika. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 24, n. 7, p. 1–8, 1985.
- CEPPI, M. et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009.
- CHAN, J. F. W. et al. Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. **Antiviral Research**, v. 141, p. 29–37, 2017.
- CHANG, C. Y. et al. Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. **GLIA**, 2015.
- CHEN, T. Research advancements in the neurological presentation of flaviviruses. **Rev Med Virol.**, v. e, n. 2021, p. 1–12, 2018.
- CHEN, Y. et al. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection. **Medical Microbiology and Immunology**, 2012.
- CHENDRIMADA, T. P. et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. **Nature**, v. 447, n. June, 2007.
- CHERAY, M.; JOSEPH, B. Epigenetics Control Microglia Plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2018.
- CHIMELLI, L. et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. **Acta Neuropathologica**, 2017.
- CHOW, B. W.; GU, C. The Molecular Constituents of the Blood-Brain Barrier. **Trends in Neurosciences**, 2015.
- CIMINI, E. et al. Human Zika infection induces a reduction of IFN- γ producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V δ 2 T-cells. **Scientific Reports**, 2017.
- COELHO, S. V. A. et al. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. **Journal of Virological Methods**, v. 246, p. 65–74, 2017.
- COFFEY, L. L. et al. Intraamniotic Zika virus inoculation of pregnant rhesus macaques produces fetal neurologic disease. **Nature Communications**, 2018.
- COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity** *Nature Immunology*, 2004.
- COLTON, C. A.; GILBERT, D. L. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. **FEBS Letters**, 1987.

- CONTRERAS, D.; ARUMUGASWAMI, V. Zika Virus Infectious Cell Culture System and the *In Vitro* Prophylactic Effect of Interferons. **Journal of Visualized Experiments**, n. 114, p. 10–13, 2016.
- CROCE, C. M.; CALIN, G. A. **miRNAs, cancer, and stem cell division** *Cell*, 2005.
- CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 2016.
- DA CONCEIÇÃO, T. M. et al. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. **Virology**, 2013.
- DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**, 2016.
- DEL CAMPO, M. et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, 2017.
- DIAGNE, C. T. et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 2–7, 2015.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–20, 1952.
- DIOP, F. et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. **PLoS ONE**, 2018.
- DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1–20, 2016.
- DOUAM, F. et al. Type III Interferon-Mediated Signaling Is Critical for Controlling Live Attenuated Yellow Fever Virus Infection In Vivo. **mBio**, 2017.
- DUAN, W. et al. The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 7, p. 919–933, 2017.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- DUMBREPATIL, A. B. et al. Viperin interacts with the kinase IRAK1 and the E3 ubiquitin ligase TRAF6, coupling innate immune signaling to antiviral ribonucleotide synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, 2019.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.
- EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4285–4290, 2014.
- EDWARDS, A. D. et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: Lack of TLR7 expression of CD8 α + DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. **European Journal of Immunology**, 2003.

ELONG NGONO, A. et al. Mapping and Role of the CD8+T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host and Microbe**, 2017.

ELTON, T. S. et al. **Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes** *Gene*, 2013.

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**, v. 93, n. 13, 2019.

EULALIO, A. et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. **Nature**, 2012.

FABRY, Z. et al. TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1995.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepi- demiological investigations in Oyo State. **J. Hyg., Camb.**, v. 83, p. 213–219, 1979.

FALASCA, L. et al. **Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: Focus on cell death** *Cell Death and Differentiation*, 2015.

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

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus, an neglected emerging disease in Africa and Asia. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 1, p. P59, 2011.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. **EcoHealth**, v. 15, n. 4, p. 864–870, 2018.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 102–114, 2008.

FONTAINE, K. A. et al. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. **Journal of Virology**, 2015.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRANÇA, G. V. A. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, 2016.

FRANCOLINI, M. et al. Role of Capsid Anchor in the Morphogenesis of Zika Virus. **Journal of Virology**, v. 92, n. 22, 2018.

FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. **Virology**, 2016.

- G. W. A. DICK. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46., n. 5, p. 521–34, 1952.
- GALLIEZ, R. M. et al. Zika virus causing encephalomyelitis associated with immunoactivation. **Open Forum Infectious Diseases**, 2016.
- GARCEZ, P. P. et al. Zika virus: Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, 2016.
- GENC, K.; TUFEKCI, K. U.; GENC, S. **The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease** *Parkinson's Disease*, 2011.
- GHOSHAL, A. et al. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. **GLIA**, 2007.
- GIULIAN, D. et al. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. **The Journal of Neuroscience**, 1989.
- GLASNER, A. et al. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. **Journal of Virology**, 2017.
- GONZÁLEZ-SCARANO, F.; BALTUCH, G. MICROGLIA AS MEDIATORS OF INFLAMMATORY AND DEGENERATIVE DISEASES. **Annual Review of Neuroscience**, 2002.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, 2010.
- GOTTWEIN, E. et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. **Nature**, v. 450, p. 1096–1099, 2007.
- GOULD, E.; SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses** *The Lancet*, 2008.
- GOURINAT, A. et al. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.
- GRAEBER, M. B.; SCHEITHAUER, B. W.; KREUTZBERG, G. W. Microglia in brain tumors. **GLIA**, 2002.
- GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. **Microglia: Biology and pathology** *Acta Neuropathologica*, 2010.
- GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.
- GRANWEHR, B. P. et al. Reviews West Nile virus: where are we now? **The Lancet**, v. 4, n. September, p. 547–556, 2004.
- GRIMSON, A. et al. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. **Cell**, v. 27, p. 91–105, 2007.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, 2015.
- HAMMOND, S. M. **MicroRNAs as oncogenes** *Current Opinion in Genetics and Development*,

2006.

HANNERS, N. W. et al. Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2315–2322, 2016.

HARAK, C.; LOHMANN, V. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. **Virology**, v. 479–480, p. 418–433, 2015.

HASSERT, M. et al. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. **PLoS Pathogens**, 2018.

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

HEINEMANN, U.; KAUFER, D.; FRIEDMAN, A. Blood-brain barrier dysfunction, TGF β signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. **GLIA**, 2012.

HEMERT, F. VAN; BERKHOUT, B. Nucleotide composition of the Zika virus RNA genome and its codon usage. **Virology Journal**, p. 1–9, 2016.

HENDRICKX, D. A. E. et al. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. **Journal of Neuroimmunology**, v. 309, p. 12–22, 2017.

HERTZOG, J. et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 7, p. 1120–1136, 2018.

HISHIKAWA, D. et al. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008.

HOLNESS, C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood**, 1993.

HONDA, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, 2005.

HORVATH, R. J. et al. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. **Journal of Neurochemistry**, 2008.

HOU, J. et al. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. **The Journal of Immunology**, 2009.

HOWARD, C. R. Aedes mosquitoes and Zika virus infection: an A to Z of emergence? **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. 2, p. e16, 2016.

HUBER, T. et al. Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2013.

HUSSMANN, K. L. et al. Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes. **Journal of Virology**, 2012.

IMAI, Y. et al. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1996.

- ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Molecular Brain Research**, 1998.
- ITO, D. et al. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1208–1215, 2011.
- IYER, A. et al. MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. **PLoS ONE**, 2012.
- JAYADEV, S. et al. Transcription factor p53 influences microglial activation phenotype. **GLIA**, 2011.
- JENNEWEIN, C. et al. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mRNA destabilization. **Journal of Biological Chemistry**, 2010.
- JOGI, M. et al. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 32, p. 48–53, 2015.
- JOST, S.; ALTFELD, M. Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. **Annual Review of Immunology**, 2013.
- JULIANO, S. A.; LOUNIBOS, L. P. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. **Ecol Lett.**, v. 8, n. 5, p. 558–574, 2005.
- JURADO, K. A. et al. Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. **Nature Microbiology**, 2018.
- KALKERI, R.; MURTHY, K. K. Zika virus reservoirs: Implications for transmission, future outbreaks, drug and vaccine development. **F1000Research**, 2017.
- KANG, C. B.; KELLER, T. H.; LUO, D. Zika Virus Protease: An Antiviral Drug Target. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 797–808, 2017.
- KAUL, D. et al. Expression of toll-like receptors in the developing brain. **PLoS ONE**, 2012.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, 2010.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, 2011.
- KESSON, A. M.; KING, N. J. C. Transcriptional Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Flavivirus West Nile Is Dependent on NF- κ B Activation. **The Journal of Infectious Diseases**, 2002.
- KHROMYKH, A. A. et al. Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13486–13500, 2012.
- KING, N. J. C.; KESSON, A. M. Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expression follow flavivirus infection. **Journal of General Virology**, 1988.
- KOHLHAAS, S. et al. Cutting Edge: The Foxp3 Target miR-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, 2009.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic Structure of Dengue Serotype 4 Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 1, p. 477–482, 2013.

- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425–428, 19 maio 2016.
- KUHN, R. J. **Understanding Zika Virus Structure and Replication**. 2015
- KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, 2016.
- LAGOS, D. et al. MiR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 513–519, 2010.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- LANNES, N.; SUMMERFIELD, A.; FILGUEIRA, L. **Regulation of inflammation in Japanese encephalitis**. **Journal of Neuroinflammation**, 2017.
- LAZEAR, H. M. et al. Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. **Science Translational Medicine**, 2015.
- LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.
- LE, M. T. N. et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. **Genes and Development**, v. 23, n. 7, p. 862–876, 2009.
- LEBRUN, G. et al. Guillain-barré syndrome after chikungunya infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 495–496, 2009.
- LEDERMANN, J. P. et al. Aedes hensilli as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.
- LEE, M. N. et al. Common Genetic Variants Modulate Pathogen-Sensing Responses in Human Dendritic Cells. **Science**, v. 343, 2014.
- LEI, J. et al. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 503–505, Jul 2016. x with a boronate inhibitor. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 503–505, 2016.
- LEIS, A. A.; STOKIC, D. S. Neuromuscular Manifestations of West Nile Virus Infection. **Frontiers in Neurology**, v. 3, n. 37, 2012.
- LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, 2016a.
- 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**, 2015.
- LI, F. et al. Serum microRNA-125b correlates with hepatitis B viral replication and liver necroinflammation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 4, p. 384.e1–384.e10, 2016b.
- LI, F. et al. AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 3, p. 3–4, 2017.
- LI, Y. Y. et al. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. **Neuroscience Letters**, 2011.

- LIANG, Q. 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**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.
- LIN, R. et al. HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. **Oncogene**, v. 20, n. 7, p. 800–811, 2001.
- LIN, S. et al. Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. **Virology**, v. 527, p. 180–187, 2019.
- LIU, Y. et al. Flavivirus infection up-regulates the expression of class I and class II major histocompatibility antigens on and enhances T cell recognition of astrocytes in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, 1989.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LUCAS, C. G. O. et al. Critical role of CD4+ T cells and IFN γ signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. **Nature Communications**, 2018.
- LUM, F. M. et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, 2017.
- LV, H. et al. TRAF6 is a novel NS3-interacting protein that inhibits classical swine fever virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- MACNAMARA, F. N. Zika Virus: a Report on Three Cases of Human Infection During an Epidemic of Jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, 1954.
- MAGNANI, D. M. et al. Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. **Nature Communications**, 2018.
- MANSUY, J. M. et al. Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.
- MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015.
- MARTÍN-ACEBES, M. A.; VÁZQUEZ-CALVO, Á.; SAIZ, J. C. **Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses** *Progress in Lipid Research*, 2016.
- MARTINEZ, N. J.; WALHOUT, A. J. M. **The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks** *BioEssays*, 2009.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. **Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis** *Immunological Reviews*, 2008.
- MATHONNET, G. et al. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. **Science**, v. 317, p. 1764–1767, 2007.
- MATSUMOTO, H. et al. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. **Journal of Neuroscience Research**, 2007.
- MATSUMOTO, M.; OSHIUMI, H.; SEYA, T. **Antiviral responses induced by the TLR3**

pathway*Reviews in Medical Virology*, 2011.

MAVIGNER, M. et al. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. **Science Translational Medicine**, 2018.

MCCRAE, A. W. R.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 552–562, 1982.

MCELROY, A. K. et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. **The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases***Brain Research Reviews*, 1995.

MCGRATH, E. L. et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. **Stem Cell Reports**, 2017.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, 2017.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.

MENDELL, J. T. **MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy***Cell Cycle*, 2005.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39–44, 2006.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. **Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism***Cell Host and Microbe*, 2017.

MINKIEWICZ, J.; DE RIVERO VACCARI, J. P.; KEANE, R. W. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. **GLIA**, 2013.

MISRA, U. K. et al. Neurological manifestations of dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**, 2006.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The new engl and journal of medicine Brief**, p. 951–958, 2016.

MOORE, S.; THANOS, S. **The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration***Progress in Neurobiology*, 1996.

MOR, G. Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development. **American Journal of Reproductive Immunology**, 2016.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Chikungunya at the Door — Déjà Vu All Over Again? **New England Journal of Medicine**, 2014.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation***Nature Reviews Immunology*, 2008.

MUSSO, D. et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

- MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887, 2015.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.
- 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. 10, n. 525, 2019.
- NAGYOSZI, P. et al. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. **Neurochemistry International**, 2010.
- NAZERAI, L. et al. A new in vivo model to study protective immunity to Zika virus infection in mice with intact type I interferon signaling. **Frontiers in Immunology**, 2018.
- NAZERAI, L.; CHRISTENSEN, J. P.; THOMSEN, A. R. A ‘Furry-Tale’ of Zika Virus Infection : What Have We Learned from Animal Models n. February 2016, p. 1–13, 2019.
- NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, 2018.
- NISHIYAMA, K. et al. Fatty acid transport protein 1 enhances the macrophage inflammatory response by coupling with ceramide and c-Jun N-terminal kinase signaling. **International Immunopharmacology**, 2018.
- NOTTROT, S.; SIMARD, M. J.; RICHTER, J. D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. **Nature**, v. 13, n. 12, p. 1108–1114, 2006.
- NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell stem cell**, 2016.
- O’NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 163–175, 2011.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 9, p. 1–3, 2014.
- OHSAWA, K. et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **Journal of cell science**, 2000.
- OUSMAN, S. S.; KUBES, P. **Immune surveillance in the central nervous system** **Nature Neuroscience**, 2012.
- PAPA, M. P. et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2557, 2017a.
- PAPA, M. P. et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 2017b.
- PARDY, R. D. et al. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. **PLoS Pathogens**, 2017.
- PAUL, S.; SHILPI; LAL, G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity . **Journal of Leukocyte Biology**, 2014.

PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69–88, 2014.

PETERSEN, C. P. et al. Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. **Cell**, v. 21, p. 533–542, 2006.

PETERSEN, E. et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 11–15, 2016.

PETITDEMANGE, C. et al. **Control of acute dengue virus infection by natural killer cells** **Frontiers in Immunology**, 2014.

PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2015.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001.

PFEFFER, S. et al. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. **Science**, v. 304, p. 734–736, 2004.

PIJLMAN, G. P. et al. A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. **Cell Host and Microbe**, v. 4, n. 6, p. 579–591, 2008.

PINGEN, M. et al. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, 2016.

PINGEN, M. et al. **Mosquito Biting Modulates Skin Response to Virus Infection** **Trends in Parasitology**, 2017.

POCCIA, F. et al. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. **Microbes Infect**, 2005.

POCCIA, F. et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses: the role played by V gamma 9V delta 2 T cells. **The Journal of infectious diseases**, 2006.

POLLARD, J. W. **Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis** **Nature Reviews Cancer**, 2004.

PONOMAREV, E. D. et al. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. **Nature Medicine**, 2011.

POTH, J. M. et al. Monocyte-Mediated Inhibition of TLR9-Dependent IFN- Induction in Plasmacytoid Dendritic Cells Questions Bacterial DNA as the Active Ingredient of Bacterial Lysates. **The Journal of Immunology**, 2010.

RASHEED, Z. et al. MicroRNA-125b-5p regulates IL-1 β induced inflammatory genes via targeting TRAF6-mediated MAPKs and NF- κ B signaling in human osteoarthritic chondrocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

RAVI, V. et al. Association of Japanese encephalitis virus infection with Guillain-Barré syndrome in endemic areas of South India. **Acta Neurologica Scandinavica**, 1994.

ROCHFORT, K. D. et al. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: Consequences for interendothelial adherens and tight junctions. **PLoS ONE**, 2014.

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**, 2012.

ROTHAN, H. A. et al. **Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells** **Molecular Neurobiology**, 2019.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. **Microglial cell origin and phenotypes in health and disease** **Nature Reviews Immunology**, 2011.

SAIKA, R. et al. MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, 2017.

SAPPARAPU, G. et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, 2016.

SAXENA, S. K. et al. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virus Disease**, v. 27, n. 2, p. 111–115, 2016.

SCHOGGINS, J. W.; RICE, C. M. **Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions** **Current Opinion in Virology**, 2011.

SCHREIBELT, G. et al. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. **The FASEB Journal**, 2007.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2016.

SCHWARTZ, M. et al. Microglial phenotype: Is the commitment reversible? **Trends in Neurosciences**, 2006.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.

SESDF, S. DE V. À S. Comportamento epidemiológico das arboviroses no Distrito Federal, até a semana epidemiológica nº 08, 2019. **Informativo epidemiológico - GDF**, v. 14, n. 8, 2019.

SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Reviews in Medical Virology**, v. e, n. 2050, p. 1–16, 2019.

SHAO, Q. et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. **Development**, 2016.

SHEN, J. et al. Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. **Journal of Virology**, 1997.

SHEN, K.; SIDIK, H.; TALBOT, W. S. The Rag-Ragulator Complex Regulates Lysosome Function and Phagocytic Flux in Microglia. **Cell Reports**, 2016.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.

SIMONIN, Y. et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, v. 12, p. 161–169, 2016.

SIMONIN, Y. et al. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus.

PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 9, p. 1–8, 2017.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.**, v. 58, n. 4, p. 335–338, 1964.

SMITH, M. E.; VAN DER MAESEN, K.; SOMERA, F. P. Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: Phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. **Journal of Neuroscience Research**, 1998.

SOFRONIEW, M. V. **Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation** **Nature Reviews Neuroscience**, 2015.

SOLOMON, T. **Recent advances in Japanese encephalitis** **Journal of NeuroVirology**, 2003.

SONG, L. et al. Cellular MicroRNAs Inhibit Replication of the H1N1 Influenza A Virus in Infected Cells. **Journal of Virology**, 2010.

STOCK, C. et al. Lysophosphatidylcholine Stimulates IL-1 Release from Microglia via a P2X7 Receptor-Independent Mechanism. **The Journal of Immunology**, 2014.

STREIT, W. J.; GRAEBER, M. B.; KREUTZBERG, G. W. **Functional plasticity of microglia: A review** **Glia**, 1988.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, 1999.

SU, W. et al. The p53 Transcription Factor Modulates Microglia Behavior through MicroRNA-Dependent Regulation of c-Maf. **The Journal of Immunology**, 2014.

SU, W.; ALOI, M. S.; GARDEN, G. A. **MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential** **Brain, Behavior, and Immunity**, 2016.

TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host and Microbe**, 2016.

TAGANOV, K. D. et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2006.

TANAKA, Y. et al. Increased lysosomal biogenesis in activated microglia and exacerbated neuronal damage after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. **Neuroscience**, 2013.

TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, 2016.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, 2016.

TENOEVER, B. R. **The Evolution of Antiviral Defense Systems** **Cell Host and Microbe**, 2016.

THOME, A. D. et al. microRNA-155 Regulates Alpha-Synuclein-Induced Inflammatory Responses in Models of Parkinson Disease. **The Journal of Neuroscience**, 2016.

THOMPSON, M. R. et al. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral

Infection. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 920–940, 23 jun. 2011.

THOUNAOJAM, M. C. et al. MicroRNA 155 Regulates Japanese Encephalitis Virus-Induced Inflammatory Response by Targeting Src Homology 2-Containing Inositol Phosphatase 1. **Journal of Virology**, v. 88, n. 9, p. 4798–4810, 2014.

THURMOND, S. et al. Suppression of type I interferon signaling by flavivirus NS5. **Viruses**, v. 10, n. 12, p. 1–16, 2018.

TILI, E. et al. Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5082–5089, 2007.

TIWARI, S. K. et al. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. **Emerging Microbes and Infections**, 2017.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

TORRENTES-CARVALHO, A. et al. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. **Immunobiology**, 2014.

TRICARICO, P. M. et al. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87- MG. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017.

TRIPATHI, S. et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 3, p. 1–19, 2017.

TU, W. et al. The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a $\gamma\delta$ T cell population in humanized mice. **The Journal of Experimental Medicine**, 2011.

VAN DEN BERG, B. et al. **Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis** *Nature Reviews Neurology*, 2014.

VAN RHIJN, I. et al. $\gamma\delta$ T cell non-responsiveness in Campylobacter jejuni-associated Guillain-Barré syndrome patients. **Neurology**, 2003.

VAN VLIET, E. A. et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation. **Epilepsia**, 2012.

VANTOUROUT, P.; HAYDAY, A. **Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology** *Nature Reviews Immunology*, 2013.

VATTI, A. et al. **Original antigenic sin: A comprehensive review** *Journal of Autoimmunity*, 2017.

VELANDIA-ROMERO, M. L.; ACOSTA-LOSADA, O.; CASTELLANOS, J. E. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. **Journal of NeuroVirology**, 2012.

VERMA, S. et al. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. **Virology**, 2009.

VERMA, S. et al. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. **Virology**, 2010.

- VIEIRA, C. J. DA S. P. et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 1–5, 2015.
- VINCENT, I. E. et al. Hepatitis b virus impairs tlr9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. **PLoS ONE**, 2011.
- VIRALZONE, S. I. B. **Zika virus**. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species#tab2>. Acesso em: 13 fev. 2019.
- WANG, K. et al. IP-10 promotes blood-brain barrier damage by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. **Frontiers in Immunology**, 2018.
- WANG, P. et al. Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. **Journal of Virology**, 2008a.
- WANG, S. et al. Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, 2008b.
- WANG, T. et al. Gamma delta T cells facilitate adaptive immunity against West Nile virus infection in mice. **J Immunol**, 2006.
- WANG, T. **Role of $\gamma\delta$ T cells in West Nile virus-induced encephalitis: Friend or foe?** **Journal of Neuroimmunology**, 2011.
- WEINBREN, M. P.; WILLIAMS, M. C. ZIKA VIRUS: FURTHER ISOLATIONS IN THE ZIKA AREA, AND SOME STUDIES ON THE STRAINS ISOLATED. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.**, v. 52, n. 3, p.263–268, 1958.
- WHO. Zika virus, microcephaly and Guillain-Barré syndrome situation report. **World Health Organization**, p. 1–6, 2017.
- WIKAN, N.; SMITH, D. R. **Zika virus: History of a newly emerging arbovirus** **The Lancet Infectious Diseases**, 2016.
- WINER, J. et al. $\gamma\delta$ T cells infiltrating sensory nerve biopsies from patients with inflammatory neuropathy. **Journal of Neurology**, 2002.
- WINKLER, C. W. et al. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. **The Journal of Immunology**, 2017.
- WONG, A. M. et al. Macrosialin increases during normal brain aging are attenuated by caloric restriction. **Neuroscience Letters**, v. 390, n. 2, p. 76–80, 2005.
- WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. **PNAS**, v. 103, n. 11, p. 4034–4039, 2006.
- WU, X. Y. et al. Regulation of microRNA-155 in Endothelial Inflammation by Targeting Nuclear Factor (NF)- κ B P65. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2014.
- WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, 2017.
- XIE, X.; SHAN, C.; SHI, P. Y. **Restriction of Zika Virus by Host Innate Immunity** **Cell Host and Microbe**, 2016.
- XU, X. et al. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-

length NS1 structure. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 20, p. 2170–2178, 2016.

XUE, M. et al. A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

YANG, Y. et al. MiR-124 Enriched Exosomes Promoted the M2 Polarization of Microglia and Enhanced Hippocampus Neurogenesis After Traumatic Brain Injury by Inhibiting TLR4 Pathway. **Neurochemical Research**, 2019.

YE, J. et al. **Immune evasion strategies of flaviviruses** **Vaccine**, 2013.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–1057, 2000.

YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 7120, n. 358, p. 933–936, 2017.

ZAMANIAN, J. L. et al. Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. **Journal of Neuroscience**, 2012.

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

ZHANG, J. et al. Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2016.

ZHAO, X. et al. Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. **Cell Reports**, v. 22, n. 8, p. 2080–2093, 2018.

ZHU, Z. et al. Comprehensive characterization of serum microRNA profile in response to the emerging avian influenza A (H7N9) virus infection in humans. **Viruses**, 2014.