

LUAN ROCHA LIMA

MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO E RESPOSTA A INTERFERONS
DO TIPO I NA NEUROLOGIA DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS ZIKA (ZIKV)



Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO

FEVEREIRO DE 2022

Trabalho a ser realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Luciana Barros de Arruda e coorientação de Yasmin Mucunã Mustafá.

CIP - Catalogação na Publicação

Rm Rocha Lima , Luan
 MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO E RESPOSTA A INTERFERONS
 DO TIPO I NA NEUROLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
 ZIKA (ZIKV) / Luan Rocha Lima . -- Rio de Janeiro,
 2022.
 56 f.

 Orientadora: Luciana Barros de Arruda .
 Coorientadora: Yasmin Mucunã Mustafá
 1. Virologia . 2. Imunologia . 3. Microbiologia
 . I. Barros de Arruda , Luciana, orient. II. Mucunã

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu
Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Luan Rocha Lima**

DRE: 118093076

BANCA EXAMINADORA: Profa. Iranaia Assunção Miranda (Presidente)

Dra. Claudia Lucia Martins Silva

Dr. Leandro Silva da Costa

Prof. Frederico Alisson da Silva (Suplente)

Título da Monografia: **“Modulação da produção e resposta a interferons do tipo I na neuropatologia da infecção pelo vírus Zika”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/vbb-pwmx-pus>

Data e hora de início: **22 de fevereiro de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2022.

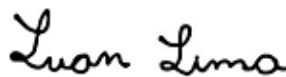
NOTA	Banca Examinadora:
10	Profa. Iranaia Assunção Miranda
10	Dra. Claudia Lucia Martins Silva
10	Dr. Leandro Silva da Costa
_____	Prof. Frederico Alisson da Silva

Presidente da banca:



Prof. Iranaia Assunção Miranda

Aluno:



Luan Rocha Lima

Orientador:



Prof. Luciana Barros de Arruda / Coorientador: M.Sc. Yasmin Mucuña Mustafá

Coordenador
de TCC



Prof. Bemadete Teixeira Ferreira Carvalho

Agradecimentos

Agradeço aos meus familiares Andrea, Carmen, Gustavo, Marcelo, Raquel e Washington por terem sempre zelado por mim com todo carinho e amor que puderam. Agradeço meus amigos, em especial Bruno, Jorge, Matheus e Leonardo pela ajuda na vida mesmo sem darem conta disso. Agradeço à minha amada Paloma por toda compreensão em momentos difíceis. Todos foram de extrema importância.

Agradeço a atenção e principalmente aos ensinamentos e exemplos por minha orientadora, Luciana Barros de Arruda e coorientadora, Yasmin Mucunã Mustafá, que foram fundamentais para minha construção como cientista.

Agradeço a todo grupo do laboratório, mas principalmente ao Sharton, Lana e Bruno, que também participaram da minha formação, me ajudaram e instruíram de diversas formas.

Agradeço às instituições de fomento que permitiram o desenvolvimento do meu trabalho junto ao laboratório, CNPq, Capes e FAPERJ.

RESUMO

LUAN ROCHA LIMA

MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO E RESPOSTA A INTERFERONS DO TIPO I NA NEUROPATOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA (ZIKV)

Orientador: Luciana Barros de Arruda

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae* e foram possuem duas linhagens filogeneticamente distintas: uma africana e uma asiática, associada a epidemia nas Américas, onde foram relatadas manifestações neurológicas e foi demonstrada a presença do vírus em tecido cerebral e líquido cefalorraquidiano. Esses achados indicam que o ZIKV atinge o sistema nervoso central e sugerem que o mesmo seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB). Nós demonstramos que cepas de ZIKV das linhagens asiática (ZIKV_{PE243}) e africana (ZIKV_{MR766}) infectam células de endotélio microvascular cerebral humano (HBMECs), que são um modelo de BBB *in vitro*. Dados preliminares sugeriram que ZIKV_{MR766} induziu expressão de IFN- β dez vezes maior em relação a ZIKV_{PE243} nessas células. A infecção sistêmica de camundongos deficientes em IFNAR (SvA129) com ZIKV_{MR766}, mas não com ZIKV_{PE243}, levou os animais a óbito, associado a permeabilidade da BBB. Nesse projeto comparamos a eficiência de infecção e os efeitos induzidos em HBMECs e modelos animais imunocompetentes e imunodeficientes infectados com as cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766}, avaliando a cinética de replicação e quantidade de partículas infecciosas geradas e a eficiência no escape a resposta ao IFN. Confirmamos que embora ambas as cepas apresentem cinética e eficiência semelhante de replicação, ZIKV_{MR766} de fato produz até 100x mais partículas infecciosas em tempos tardios a infecção e induz uma produção maior e mais rápida de IFN- β , associada a um aumento da expressão do receptor do tipo Toll 3 (TLR3). Observamos, ainda, que o ZIKV_{MR766} é cerca de 10 vezes mais resistente ao IFN- β quando comparado com o ZIKV_{PE243}. Ambos os vírus foram capazes de replicar no cérebro de camundongos SvA129 (IFNAR^{-/-}) inoculados via icv, porém ZIKV_{MR766} foi capaz de produzir até 10x partículas infecciosas nesse animal. A resistência e escape a resposta ao IFN- β por ZIKV_{MR766} foi confirmada *in vivo* quando observamos que apenas ZIKV_{MR766} foi capaz de produzir partículas infecciosas no cérebro de Sv129 (IFNAR^{+/+}) inoculados via icv mas não levando esses animais a óbito. Notamos também que ZIKV_{MR766} induziu produção de IFN- β até 10x maior a em ambos os modelos animais, e induziu resposta até 2x maior ao IFN-I em animais Sv129 (IFNAR^{+/+}). Conjunto de dados mostra que apenas a replicação de ZIKV não é suficiente para indução da neuropatologia e destaca a importância do interferon para proteção desses animais.

Palavras-chave: Vírus Zika, Células Endoteliais, Interferon, Barreira Hematoencefálica

ABSTRACT**LUAN ROCHA LIMA****MODULATION OF PRODUCTION AND RESPONSE TO TYPE I INTERFERONS
IN THE NEUROPATHOLOGY BY ZIKA VIRUS (ZIKV) INFECTION****Orientador: Luciana Barros de Arruda**

Zika virus (ZIKV) belongs to the Flaviviridae family and has two phylogenetically distinct lineages: one African and one Asian, associated with the epidemic in the Americas, where neurological manifestations were reported and was demonstrated the presence of the virus in brain tissue and cerebrospinal fluid. These findings indicate that ZIKV reaches the central nervous system and suggest that it is able to cross the blood-brain barrier (BBB). We demonstrate that Asian (ZIKV_{PE243}) and African (ZIKV_{MR766}) strains of ZIKV infect human brain microvascular endothelium cells (HBMECs), which are a model of BBB *in vitro*. Preliminary data suggested that ZIKV_{MR766} induced ten-fold higher IFN- β expression than ZIKV_{PE243} in these cells. Systemic infection of IFNAR-deficient mice (SvA129) with ZIKV_{MR766}, but not with ZIKV_{PE243}, led to death, associated with BBB permeability. In this project, we compared the infection efficiency and the induced effects in HBMECs and immunocompetent and immunodeficient animal models infected with the ZIKV_{PE243} and ZIKV_{MR766} strains, evaluating the replication kinetics and the amount of infectious particles generated and the efficiency in escaping the IFN response. We confirm that although both strains show similar replication kinetics and efficiency, ZIKV_{MR766} does indeed produce about 100 times more infectious particles at late times of infection and induces higher and faster production of IFN- β , associated with an increase in Toll-like receptor expression 3 (TLR3). We also observed that ZIKV_{MR766} is about 20 times more resistant to IFN- β when compared to ZIKV_{PE243}. Both viruses were able to replicate in the brain of SvA129 (IFNAR^{-/-}) mice inoculated via icv, but ZIKV_{MR766} was able to produce up to 10x infectious particles in this animal. Resistance and escape response to IFN- β by ZIKV_{MR766} was confirmed *in vivo* when we observed that only ZIKV_{MR766} was able to produce infectious particles in the brain of Sv129 (IFNAR^{+/+}) inoculated via icv but not leading these animals to death *in vivo*. We also noticed that ZIKV_{MR766} induced up to 10x higher IFN- β production in both animal models, and induced up to 2 times higher response to IFN-I in Sv129 animals (IFNAR^{+/+}). Data set shows that ZIKV replication alone is not enough to induce neuropathology and highlights the importance of interferon for protection of these animals.

Key-words: Zika Virus, Endothelial Cells, Interferon, Blood Brain Barrier

RESUMO PARA LEIGOS

LUAN ROCHA LIMA

MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO E RESPOSTA A INTERFERONS DO TIPO I NA NEUROPATOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA (ZIKV)

Orientador: Luciana Barros de Arruda

O vírus Zika (ZIKV) possui duas linhagens principais: uma africana e outra asiática, associada a epidemia recente nas Américas. Durante essa epidemia foram relatados casos de microcefalia e outras manifestações neurológicas. Foi demonstrada a presença do vírus no sistema nervoso central (SNC), sugerindo que o ZIKV seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), estrutura responsável por proteger o SNC. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que ZIKV das linhagens asiática (ZIKV_{PE243}) e africana (ZIKV_{MR766}) infectam as células HBMECs, um modelo de estudo da BBB *in vitro*. Dados preliminares sugeriram que ZIKV_{MR766} induzi expressão de IFN- β (proteína com papel antiviral) dez vezes maior em relação a ZIKV_{PE243} nessas células. Vale citar que respostas exacerbadas também podem ser prejudiciais ao indivíduo. Camundongos SvA129 (não possuem o receptor de IFN-I ou IFNAR) infectados via sistêmica com ZIKV_{MR766}, mas não com ZIKV_{PE243}, levou os animais a óbito, associado a danos de continuidade na BBB, mostrando maior virulência nessa cepa. Nesse projeto comparamos a eficiência de infecção e os efeitos induzidos em HBMECs e em modelos animais infectados com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, avaliando sua replicação e a eficiência no escape a resposta ao IFN-I. Mostramos que ZIKV_{PE243} tem maior afinidade com as HBMEC, se ligando mais fácil a elas, porém ZIKV_{MR766} se mostrou mais eficiente em infecta-las. Confirmamos que embora ambas as cepas apresentem cinética e eficiência semelhante de replicação, a infecção com ZIKV_{MR766} de fato induz uma produção maior e mais rápida de IFN- β , associada a um aumento da expressão de TLR3 (um dos receptores responsáveis por detectar o vírus e in iniciar resposta imune). Observamos que ZIKV_{MR766} é cerca de 10 vezes mais resistente ao IFN-I quando comparado com o ZIKV_{PE243}. Esse também foi confirmado *in vivo*, em modelos animais infectados diretamente no cérebro. Também observamos maior eficiência de ZIKV_{MR766} se replicar e induzir maior resposta ao IFN-I, o que pode ser responsável por causar dano à BBB e por levar os SvA129 à óbito.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura genômica e ciclo replicativo do ZIKV.....	03
Figura 2: Reconhecimento do ZIKV pelo sistema imune inato.....	07
Figura 3: Produção de ISGs e a indução do estado anti-viral.....	09
Figura 4: Papel das proteínas não estruturais do ZIKV no escape da resposta ao interferon.....	11
Figura 5: ZIKV _{PE243} e ZIKV _{MR766} apresentam cinética semelhante de replicação em HBMECs.....	22
Figura 6: ZIKV _{MR766} possui maior eficiência de entrada em HBMEC que ZIKV _{PE243}	24
Figura 7: ZIKV _{MR766} induz maior expressão de TLR3 do que ZIKV _{PE243}	25
Figura 8: ZIKV _{MR766} induz maiores níveis de RNAm de IFN- β que ZIKV _{PE243}	27
Figura 9: ZIKV _{MR766} é mais resistente ao IFN-I do que ZIKV _{PE243}	28
Figura 10: Produção e resposta a interferons do tipo I não impede a replicação de ZIKV _{MR766} , mas protege contra infecção letal em modelos experimentais murinos.....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequências de primers e sonda utilizados para os ensaios de PCR em tempo real.....	20
---	----

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Histórico epidemiológico	01
1.2. Estrutura genômica e ciclo replicativo do ZIKV.....	01
1.3. Fisiopatologia e quadro clínico.....	04
1.4. Barreira Hematoencefálica e o ZIKV.....	04
1.5. Reconhecimento e ativação de resposta imune inata por ZIKV.....	06
1.6. Interferons e seu papel antiviral e protetor.....	08
1.7. Mecanismos de escape da resposta ao interferon por diferentes flavivírus.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MÉTODOS.	14
4.1. Cultura de Células.....	14
4.2. Manutenção dos estoques virais.....	14
4.3. Titulação viral por ensaio de plaque.	15
4.4. Infecção das HBMECs com ZIKV.....	15
4.5. Infecção de camundongos e obtenção de tecidos para análise de carga viral <i>in vivo</i>	16
4.6. Manutenção e processamento do tecido dos animais.....	16
4.7. Medida de RNA viral por RT-qPCR.....	17
4.8. Análise da indução de IFN-I em células e animais infectadas por ZIKV.....	17
4.9. Análise de adsorção e entrada viral.....	18
4.10. Análise da expressão de RIG-I e TLR3 por Western Blotting.....	18
4.11. Avaliação da resistência de ZIKV a IFN-I.....	19
4.12. Análises estatísticas.....	20

5. RESULTADOS.....	21
5.1. ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} apresentam cinética semelhante de replicação em HBMECs.....	21
5.2. ZIKV_{MR766} possui maior eficiência de entrada em HBMEC que ZIKV_{PE243}	23
5.3. ZIKV_{MR766} induz maior expressão de TLR3 do que ZIKV_{PE243}.....	24
5.4. ZIKV_{MR766} induz maiores níveis de RNAm de IFN-β que ZIKV_{PE243}.....	26
5.5. ZIKV_{MR766} é mais resistente ao IFN-I do que ZIKV_{PE243}.....	27
5.6. Produção e resposta a interferons do tipo I não impede a replicação de ZIKV_{MR766}, mas protege contra infecção letal em modelos experimentais murinos	29
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÕES.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico epidemiológico

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus, ou seja, é transmitido para humanos principalmente através da picada de algumas espécies de mosquitos *Aedes spp.* que também são vetores de outros flavivírus, como o Vírus da encefalite Japonesa (JEV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV), Vírus da Dengue (DENV) e o Vírus da Febre Amarela (YFV) (Gubler *et al.*, 2017). Entretanto, outras formas de transmissão foram descritas para ZIKV, particularmente a transmissão vertical (Mlakar *et al.*, 2016). O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir do soro de um macaco rhesus, na floresta Zika na Uganda. O primeiro caso de infecção por ZIKV em humanos ocorreu também na Uganda entre 1962-1963 e até 2006 apenas 13 casos de infecção natural por ZIKV haviam sido reportados, todos na África ou Ásia (Simpson *et al.*, 1964, Fagbami *et al.*, 1979, Oehler *et al.*, 2013). Em 2007 ocorreu o primeiro surto de ZIKV fora desses continentes, na ilha de Yap, na Oceania no oceano Pacífico (Lanciotti *et al.*, 2008). A partir de 2010, casos esporádicos de infecção pelo ZIKV foram relatados em países do sudeste asiático. Em 2013 o ZIKV chegou na Polinésia Francesa e em outras ilhas do Pacífico (Cao-Lormeau *et al.*, 2013). Parte dos casos clínicos relatados nesse surto apresentou características clínicas semelhantes àquelas observadas no surto de Yap de 2007, porém, alguns dos casos graves foram reportados e associados a complicações neurológicas (Oehler *et al.*, 2013). Em 2015 o ZIKV foi detectado pela primeira no Brasil (Campos *et al.*, 2015). Ainda em 2015, foi observado aumento do número de recém-nascidos com microcefalia nas áreas afetadas pelo ZIKV (Schuler-Faccini L *et al.*, 2016). A partir de 2016, o ZIKV se espalhou para outros países da América do Sul (Bogoch *et al.*, 2016). No mesmo ano, a Organização Mundial da Saúde reconheceu o ZIKV como “emergência de saúde pública internacional” devido, principalmente, a provável associação entre a transmissão vertical de ZIKV e o desenvolvimento de microcefalia (OMS 2016, acesso em setembro de 2021).

1.2. Estrutura genômica e ciclo replicativo do ZIKV

O ZIKV é um vírus envelopado, com genoma de RNA fita simples sentido positivo, pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Seu genoma possui quase 11 mil nucleotídeos (Kuno *et al.*, 2007) que codificam três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana precursora (prM) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1A). As proteínas estruturais e o RNA genômico viral, formam vírions. As

proteínas não estruturais participam da replicação viral, montagem e evasão do sistema imune do hospedeiro (Javed *et al.*, 2018). Análises filogenéticas, baseadas nas sequências completas de genoma de ZIKV demonstraram que a existência de duas linhagens distintas (Gong *et al.*, 2016): uma asiática, que é associada a epidemia de 2015 nas Américas, e outra linhagem africana, descrita previamente em outras regiões. Diversos tipos celulares já foram reportados como permissivos à infecção por ZIKV, incluindo neurônios (Li *et al.*, 2016); astrócitos, microglia e oligodendrócito; (Retallack *et al.*, 2016); células da placenta, como trofoblastos, células endoteliais, fibroblastos células de Hofbauer (Tabata *et al.*, 2016), macrófagos da placenta (Quicke *et al.*, 2016) e células HUVEC (Khaiboullina *et al.*, 2019). Além dessas, nosso grupo descreveu que o ZIKV também é capaz de infectar células do endotélio microvascular cerebral humano (HBMEC) (Papa *et al.*, 2017).

O receptor tirosina quinase AXL e a molécula de adesão intercelular específica para células dendríticas (DC-SIGN) podem facilitar a entrada e adesão de flavivírus (Hamel *et al.*, 2015). A entrada de ZIKV é aumentada pela expressão de Axl (Meertens *et al.*, 2017), contudo o nocaute de Axl em células progenitoras neurais e organoides não restringiu a infectividade do ZIKV ou morte celular (Wells *et al.*, 2016), e não preveniu a patologia do ZIKV em camundongos (Hastings *et al.*, 2017), sugerindo que Axl não é o principal receptor usado pelo ZIKV para adsorção nas células testadas ou que há redundância funcional nos receptores. Ainda não é claro se as cepas de ZIKV de linhagens africanas e asiáticas possuem a mesma afinidade aos receptores para adesão à superfície celular para iniciar a infecção. Como mostrado na figura 1B, após a ligação do ZIKV com o receptor da célula hospedeira, o vírus entra na célula por endocitose mediada por clatrina de forma dependente de sua glicoproteína E que, em pH ácido, sofre alterações estruturais, permitindo a fusão do envelope viral com a membrana endossômica e a liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (Song *et al.*, 2017). Após a entrada na célula hospedeira, o genoma do ZIKV é traduzido em uma única poliproteína contendo as três proteínas estruturais e as sete proteínas não estruturais. A clivagem da poliproteína é mediada por proteases do hospedeiro, e pela NS3 codificada pelo vírus (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A replicação do genoma viral ocorre quando as proteínas NS do ZIKV se reúnem no retículo endoplasmático (ER) para formar o complexo de replicação viral (RC), que também contém proteínas da célula hospedeira necessários para a síntese de novas cópias de RNA viral (Song *et al.*, 2017). Após a replicação, é dado início o processo de montagem de novas partículas virais, que ocorre próximo ao retículo endoplasmático. O genoma do vírus é envolvido pelas proteínas estruturais formando os vírions que são

transportados com auxílio de proteínas NS através da via secretora do hospedeiro até chegarem a membrana da célula. As novas partículas virais formadas são liberados da célula por meio de exocitose (Song *et al.*, 2017).

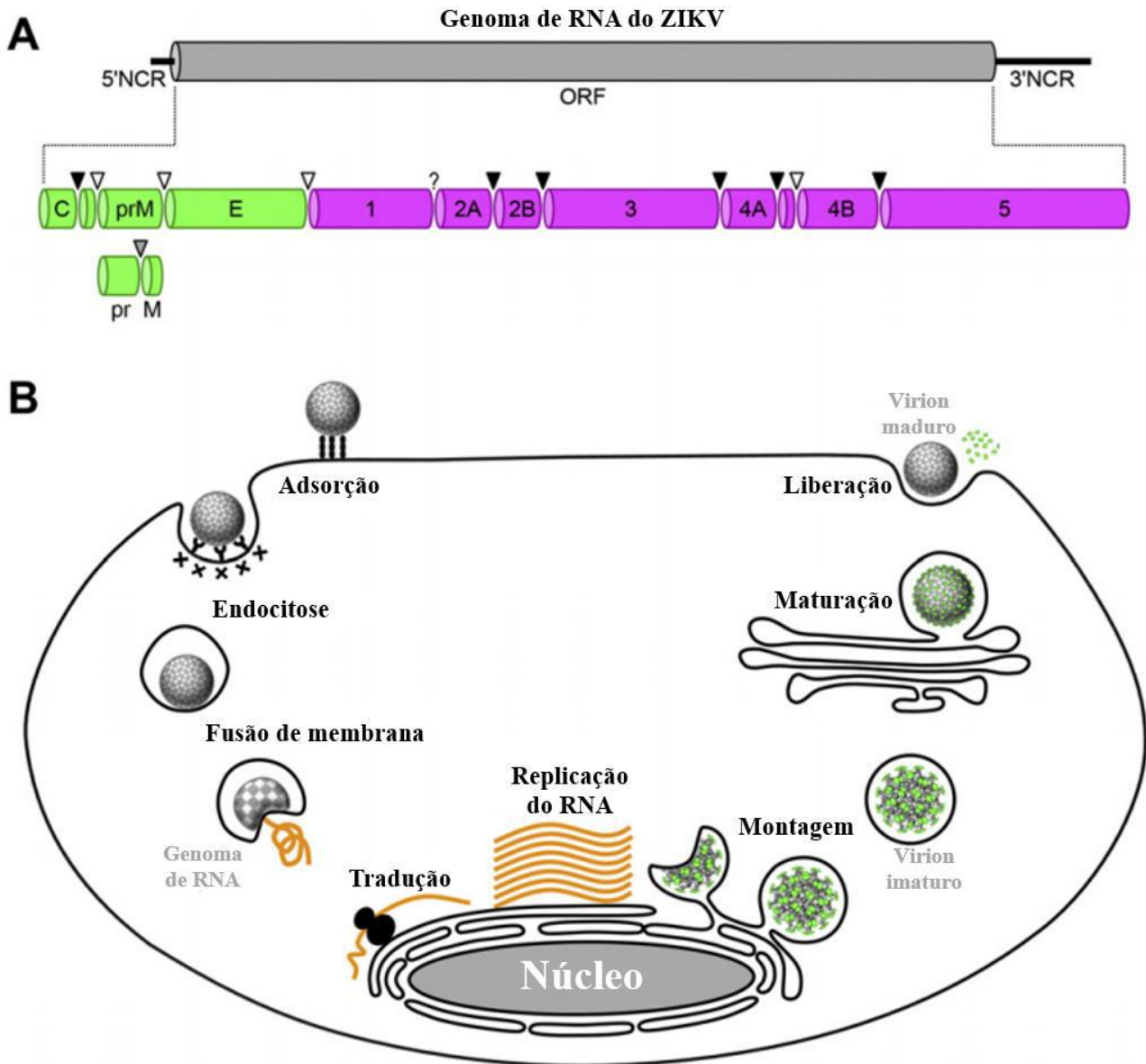


Figura 1: Estrutura genômica e ciclo replicativo do ZIKV. (A) Representação esquemática do genoma do ZIKV, mostrando o genoma viral em cinza, as proteínas estruturais em verde e as proteínas não estruturais em roxo. (B) Ciclo replicativo do ZIKV com as principais etapas : adesão, adsorção, endocitose, fusão da membrana, tradução do genoma viral, replicação do RNA, montagem das partículas virais, maturação e sua liberação. (Yun and Lee, 2014)

1.3. Fisiopatologia e quadro clínico

A infecção por ZIKV é assintomática na grande maioria dos casos e, quando ocorrem os sintomas são geralmente leves, autolimitados e inespecíficos, se manifestando de 3-12 dias após a infecção. Os sinais e sintomas clínicos da doença branda incluem febre, conjuntivite, dores de cabeça e nas articulações e mialgia, raramente durando mais de 2 semanas (Oehler *et al.*, 2013). Durante os surtos mais recentes, na Polinésia Francesa e no Brasil, no entanto, outras manifestações clínicas foram relatadas, associadas a síndromes neurológicas. A ligação entre o ZIKV e anomalias do sistema nervoso central (SNC) começou em 2015 quando foi reportado um surto do vírus junto com aumento da incidência de recém-nascidos com microcefalia no Brasil (Schuler-Faccini *et al.*, 2016). Os casos de microcefalia e de outras desordens neurológicas em fetos, recém-nascidos e natimortos foram associadas a infecção materna e transmissão vertical de ZIKV (Mlakar *et al.*, 2016). Síndromes acometendo sistema nervoso periférico e central também foram reportadas em adultos, incluindo Síndrome de Guillain-Barré, encefalite e encefalomielite (Oehler *et al.*, 2013 e Broutet *et al.*, 2016). O RNA do ZIKV já foi detectado no cérebro de camundongos inoculados por diferentes vias (Cugola *et al.*, 2016); em organóides cerebrais infectados *in vitro* (Pignatari *et al.*, 2016); no líquido cefalorraquidiano de macacos rhesus infectados (Garcez *et al.*, 2016); em tecido cerebral de fetos com microcefalia (Mlakar *et al.*, 2016) e líquido cefalorraquidiano de adultos (Dudley *et al.*, 2016), sugerindo que, após disseminação, o vírus atravessa a barreira hematoencefálica (BBB), atingindo o SNC. A patogênese da infecção pelo ZIKV e os mecanismos utilizados pelo vírus para a chegar ao SNC ainda não são claros.

1.4. Barreira hematoencefálica e o ZIKV

A barreira hematoencefálica (BBB) é uma estrutura complexa, formada por células endoteliais, associadas a pericitos, astrócitos e micróglia. As células endoteliais que formam a BBB estão fortemente aderidas e a integridade dessa estrutura é fundamental para o controle do fluxo de solutos, células e patógenos, incluindo vírus, da circulação para o SNC (Mustafá *et al.*, 2019). Dessa forma, infecções virais no SNC e neuroinflamação podem induzir o aumento da permeabilidade das células endoteliais (Dallasta *et al.*, 1999). Nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos da infecção por ZIKV em células endoteliais microvascular cerebral humana (HBMEC), utilizadas como modelo de BBB *in vitro*, analisando os mecanismos de replicação viral, ativação e estresse celular, e permeabilidade. As HBMECs são permissíveis a

infecção pelas cepas ZIKV_{MR766} (Africana) e ZIKV_{PE243} (Brasileira). A infecção dessas células resultou na liberação baso-lateral de partículas infecciosas (Papa *et al.*, 2017). Nosso grupo também mostrou que os vírus cruzaram a barreira endotelial sem aumento aparente na permeabilidade, o que foi confirmado pela manutenção da expressão e localização de proteínas de junções ocludentes (Papa *et al.*, 2017). No mesmo estudo, foi possível notar algumas diferenças entre as cepas usadas: ZIKV_{PE243} não induziu um efeito citopático notável e nem morte celular nas culturas, enquanto a infecção com ZIKV_{MR766} induziu efeito citopático e morte celular em períodos mais tardios da infecção.

Para entendimento da patogênese da infecção por ZIKV *in vivo*, diferentes modelos animais têm sido utilizados. Camundongos adultos são pouco suscetíveis a infecção por ZIKV e não desenvolvem sintomas da infecção, limitando sua utilidade como modelo de doença. Como alternativa, tem-se utilizado animais imunodeficientes, como os camundongos SvA129 (deficientes em IFNAR, o receptor para Interferon do tipo I). Esses animais são suscetíveis a infecção mesmo quando adultos, demonstrando a importância da resposta induzida por IFN do tipo I na proteção a infecção por ZIKV. Nosso grupo estabeleceu um modelo de infecção sistêmica (intravenosa) utilizando esses camundongos e demonstramos a replicação de ambas as cepas de ZIKV, com detecção de replicação viral em tecidos sistêmicos e no cérebro. Quando infectados com ZIKV_{MR766}, os camundongos SvA129 vieram a óbito, mas os camundongos infectados com ZIKV_{PE243}, não. ZIKV_{MR766} também demonstrou maior replicação no cérebro desses animais ao comparar com ZIKV_{PE243}. Deve-se considerar que a cepa ZIKV_{MR766}, quando isolada, foi extensivamente passada em cérebros de camundongos (Dick, Kitchen e Haddow, 1952), o que poderia explicar alguns dados relatados acima. Importante apontar que os vírus foram detectados no cérebro dos camundongos antes de apresentar ruptura na barreira hematoencefálica, corroborando os dados *in vitro* de que o vírus é capaz de infectar e atravessar a barreira de células endoteliais, sem alterar sua integridade (Papa *et al.*, 2017). No entanto, evidências de ruptura da BBB foram observadas em períodos subsequentes, mas apenas naqueles animais que vieram a óbito, sugerindo que esse evento pode ser determinante para lesão neurológica e morte induzidas pela infecção (Lucas *et al.*, 2018).

1.5. Reconhecimento e ativação de resposta imune inata por ZIKV

O reconhecimento de patógenos virais é o primeiro ponto para início de uma resposta do sistema imune inato. As células de mamíferos utilizam os PRRs (receptores de reconhecimento de patógenos) que são proteínas capazes de reconhecer PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) presentes durante o curso da infecção. Os PRRs podem estar presentes ligados à membrana na superfície das células ou em vesículas endocíticas, ou no citoplasma (Medzhitov *et al.*, 1997). Os PRRs reconhecem diferentes proteínas virais estruturais, como proteínas do envelope e capsídeo, ou não estruturais, como seu genoma. Ao ocorrer essa ligação, é iniciada uma cascata de reações que induzirão a formação de uma resposta imunológica para o controle da infecção, como a secreção de citocinas inflamatória, quimiocinas, e de interferons do tipo I (IFN- α/β). Vírus que apresentam RNA como genoma, como o ZIKV, podem ser reconhecidos por sensores de RNA citoplasmáticos ou intravesiculares. Entre os sensores de RNA citoplasmáticos podemos citar os RLR (*RIG-I-like receptors*) e os sensores de RNA vesiculares são os receptores do tipo Toll (TLRs, de *tlr-like receptors*) (Figura 2). TLR-7 e TLR-8 reconhecem fitas simples de RNA, enquanto RIG-I e o TLR3 reconhecem RNAs de fita dupla. O ZIKV tem RNA fita simples como genoma e, durante sua replicação, ocorre a formação da estrutura de RNA de fita dupla, um intermediário de replicação. Portanto, o ZIKV, pode ser reconhecido por TLR7 e TLR8 ou TLR3 endossômicos, ou por RIG-I no citoplasma. A ligação da fita dupla de RNA viral, causa uma mudança conformacional em RIG-I, que é translocado para mitocôndria, onde ocorre interação com MAVS (proteína de sinalização antiviral mitocondrial) e sua ativação (Kell *et al.*, 2015) que leva a ativação de TBK1 (TANK-binding kinase 1) e IKK ϵ (I κ B kinase) (McNab *et al.*, 2015). Após a reconhecimento da fita dupla de RNA viral, TLR3 interage com TRIF (TIR domain-containing Adaptor inducing interferon β), que interage com TRAF3. Essa interação leva a ativação de TBK1 e IKK ϵ (Nazmi *et al.*, 2014). TBK1 e IKK ϵ promovem ativação de IRF-3, IRF-5 e IRF-7 (Fator regulador de interferon) e NF- κ B (Fator nuclear-Kappa Beta) que são translocados para o núcleo celular levando a transcrição de citocinas inflamatórias, e de IFNs do tipo I (Suthar *et al.*, 2013).

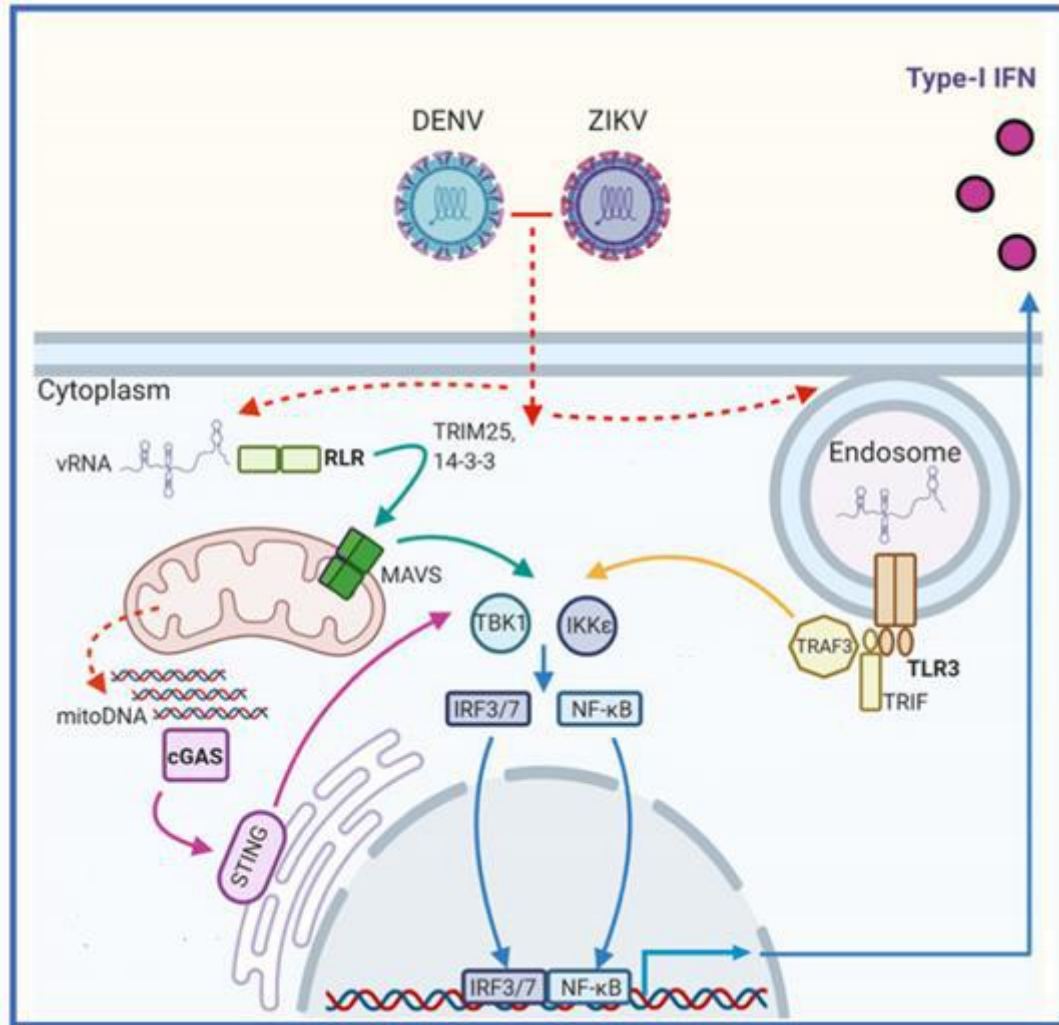


Figura 2: Reconhecimento do ZIKV pelo sistema imune inato. Após entrada na células, o RNA viral pode ser reconhecido por sensores vesiculares, como o TLR3 (setas amarelas), ou por sensores citoplasmáticos, como os receptores do tipo RIG-I (RLR, *RIG-I like receptors*) (setas verdes). A infecção por ZIKV resulta na estimulação e ativação de STING (estimulador de genes de IFN) (setas roxas). Essas vias levam à fosforilação de TBK1 e IKKε que ativam IRF3/7 e NF-κB, que são fatores de transcrição que regulam positivamente a produção de IFN do tipo I. (Adaptado de Coldbeck-Shackley *et al.*, 2020).

1.6. Interferons e seu papel antiviral e protetor

Os interferons são citocinas pró-inflamatórias que participam de diferentes eventos da resposta imunológica, como auxiliar na resposta a infecções, e recrutar outros tipos celulares. São classificados em tipo I (IFN- α e β), tipo II (IFN- γ), e tipo III (IFN- λ), de acordo com o receptor celular e resposta que ativam. Os IFNs do tipo I são fundamentais na resposta antiviral (Takaoka *et al.*, 2006). Diversos tipos celulares são capazes de produzir IFN-I (Schneider *et al.*, 2014). Após a infecção por flavivírus e outros vírus, a produção de IFN é desencadeada principalmente pelo reconhecimento do RNA viral por PRRs, como descrito. O IFN-I secretado pela célula e se liga ao receptor de IFN-I (IFNAR) presente na superfície de forma autocrina ou paracrina (Figura 3). Após a ligação do IFN aos seus receptores na superfície celular, ocorrem mudanças conformacionais levando a ativação de JAK, que se encontra ligado a porção citoplasmática do receptor. Quando ativada, JAK promove a ligação a STAT. No caso do IFN-I, os STATs fosforilados nessa ligação são STAT1 e STAT2. Esse evento de fosforilação leva à interação com IRF9 (fator regulador de IFN). Esse complexo é translocado para o núcleo celular e atua como ativador transcricional se ligando à ISRE (elementos reguladores estimulados por IFN) no DNA a montante dos ISGs, resultando na transcrição de centenas de ISGs (genes estimulados por interferon) (Suthar *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2014). Dentre os ISGs de função conhecida, podemos citar IRFs e PRRs, que amplificam a resposta, sensibilizando as células para a detecção de patógenos; a 2'5' oligoadenilato sintetase (OAS), que ativa RNase L, capaz de detectar e degradar RNA exógeno, contribuindo para restringir a replicação e disseminação viral; e o MX1 capaz de se ligar a componentes virais e impedindo seu translocamento celular, inibindo a replicação do vírus (Schneider *et al.*, 2014). Alguns ISGs codificam proteínas pró-apoptóticas, levando à morte celular sob certas condições (Schneider *et al.*, 2014).

A resposta por IFN-I *in vitro* é induzida por DENV e WNV e o pré-tratamento com IFN-I resulta na inibição da replicação desses vírus (Muñoz e Fredericksen, 2010). Foi observada a indução de resposta a IFN-I durante a infecção por ZIKV em células da BBB (Mustafá *et al.*, 2018) e a indução de ISGs em células dendríticas humanas (Bowen *et al.*, 2017). A replicação do ZIKV foi reduzida em diversos tipos de células humanas na presença de IFN-I (Hamel *et al.*, 2015), mostrando que a resposta por IFN-I é fundamental para o controle da replicação e disseminação do vírus. Apesar de haver resposta por IFN-I, DENV, WNV e ZIKV ainda são capazes de estabelecer infecções produtivas, o que indica que esses vírus possuem maneiras de antagonizar ou escapar da resposta por IFN-I.

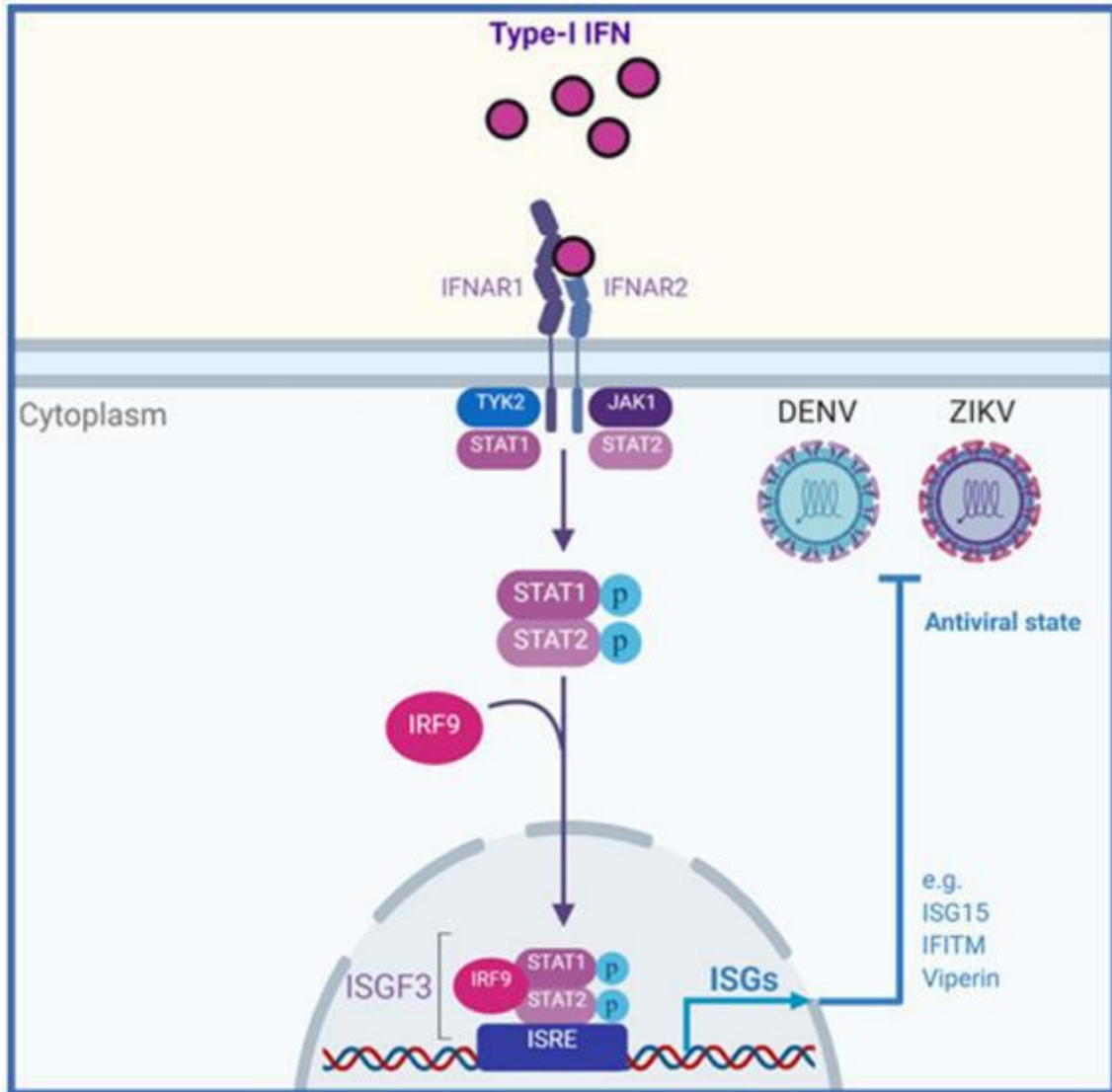


Figura 3: Produção de ISGs e a indução do estado anti-viral. Após a detecção de vírus pelo sistema imune inato, ocorre uma cascata de reação que resultam na produção e secreção de IFNs. Após secretado, o IFN-I se liga ao seu receptor de superfície celular (IFNAR), ativando a sinalização da via de JAK-STAT (setas pretas), levando à fosforilação de STAT1 e STAT2, que se ligam à IRF9, formando o complexo ISGF3, que regula positivamente a transcrição de genes estimulados por interferon (ISGs). Os ISGs são responsáveis por promover efeitos antivirais contra ZIKV. (Adaptado de Coldbeck-Shackley *et al.*, 2020).

1.7. Mecanismos de escape da resposta ao interferon por diferentes flavivírus

Muitos vírus desenvolveram mecanismos para antagonizar respostas antiviral do hospedeiro. Os mecanismos desenvolvidos por flavivírus para antagonizar a resposta IFN costumam ser redundantes e baseiam-se no antagonismo da ativação de PRRs específicos ou inibição ou degradação de moléculas e proteínas da via de indução de IFN ou de resposta a IFN (Figuras 4). Esses mecanismos de antagonismo a resposta ao hospedeiro estão ligados com a função de algumas de suas proteínas não estruturais. Na presença de IFN-I em determinados tipos celulares, as proteínas NS2A e NS4 do DENV aumentaram a replicação de vírus sensíveis a IFN-I, e quando expressa juntas, a NS2A e a NS4 foram capazes de eliminar completamente a sinalização de IFN-I, indicando que essas proteínas são capazes de inibir a via de sinalização de IFN-I (Munoz *et al.*, 2003). A proteína não estrutural NS4B dos vírus DENV, YFV e WNV também apresentou função no antagonismo da via de IFN pois foi capaz de prejudicar a sinalização de JAK/STAT em células Vero (Munoz *et al.*, 2005). A NS4 do DENV se mostrou capaz fazer o antagonismo a via de IFN se ligando a MAVS, bloqueando sua interação com RIG-I, impedindo a via de sinalização desse receptor (He *et al.*, 2016). Outra proteína com importante papel no antagonismo na resposta ao IFN é a NS5. A NS5 do JEV inibe a produção de IFN-I bloqueando a translocação de IRF3 e NF- κ B do citoplasma para o núcleo (Ye *et al.*, 2017). Em relação a DENV, sua NS5 é capaz de promover degradação de STAT2, bloqueando resposta induzida por IFN-I (Ashour *et al.*, 2009). Assim como outros flavivirus, o ZIKV desenvolveu mecanismos para escape da resposta inata antiviral. A NS3 do ZIKV bloqueia a sinalização antiviral mediada por RIG-I (Riedl *et al.*, 2019) A sua NS5, assim como a de DENV, inibe a sinalização de IFN-I em células humanas ao se ligar e degradar o STAT2 humano (Grant *et al.*, 2016).

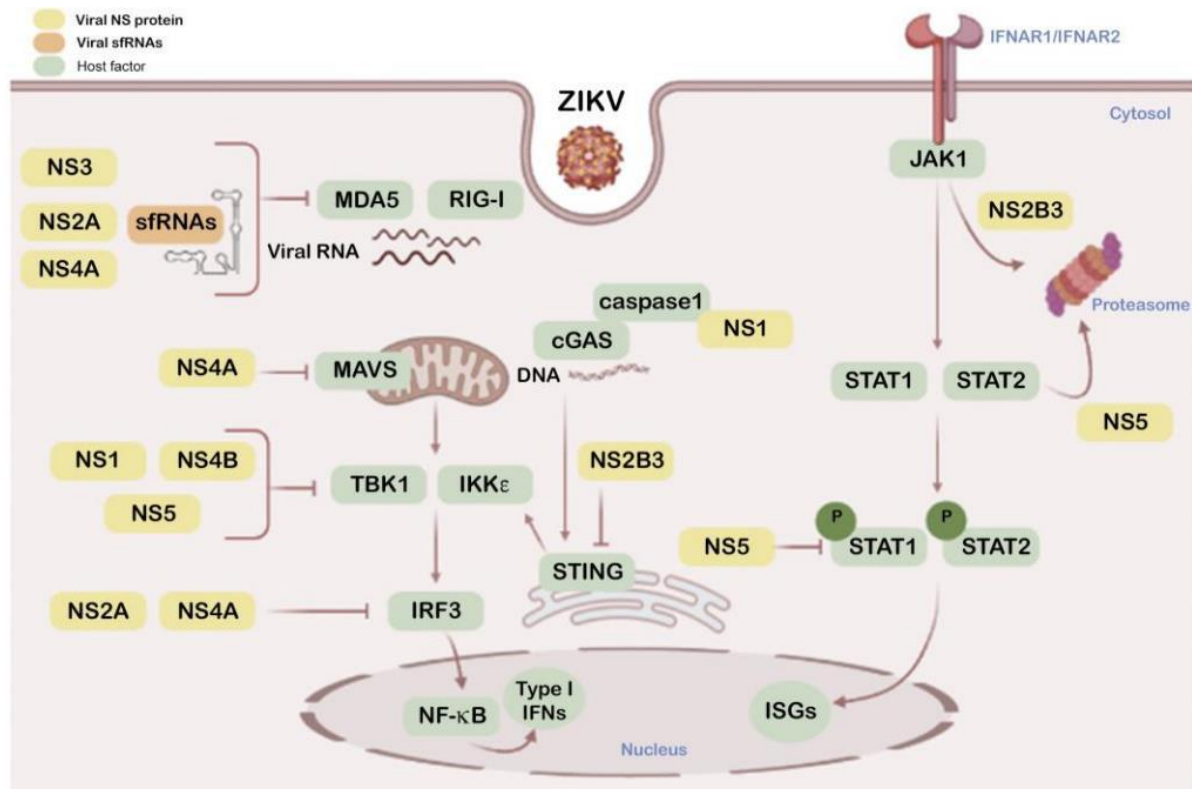


Figura 4: Papel das proteínas não estruturais do ZIKV no escape da resposta ao interferon. A figura mostra onde e quais proteínas do ZIKV (em amarelo) e sfRNAs (em laranja) interagem com fatores celulares (em verde) para impedir a elaboração da resposta antiviral mediada por interferon. (Estévez-Herrera *et al.*, 2021)

Dados do nosso grupo demonstraram que cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} infectam e replicam em HBMECs *in vitro* e induzem a expressão de IFN- β (Papa *et al.*, 2017), sendo ZIKV_{MR766} capaz de induzir níveis detectáveis de IFN- β a partir de 16 horas após a infecção, enquanto ZIKV_{PE243} induzia níveis detectáveis de IFN- β somente a partir de 24 horas após a infecção (Mustafá *et al.*, 2018). A cepa africana (ZIKV_{MR766}) também foi capaz de induzir a morte celular em HBMECs mais rapidamente que a cepa brasileira (ZIKV_{PE243}) (Papa *et al.*, 2017). A infecção por ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} em HBMECs resultou em uma inibição da resposta a IFN- β e modulação negativa da expressão de ISGs, o que deve estar associado a permissividade a replicação e extravasamento de vírus. Por outro lado, essas células ainda podem produzir IFN- β e secretá-lo e esse pode induzir o estado antiviral em células adjacentes não infectadas, restringindo a replicação do vírus no tecido (Mustafá *et al.*, 2018). Suas estratégias não são bem compreendidas como de outros flavivirus, tornando necessários mais estudos para o melhor entendimento de como o escape as respostas inatas do hospedeiro por esses flavivirus impacta

na progressão e severidade da doença. Foi observado que camundongos deficientes em IFNAR e STAT2 infectados com ZIKV apresentaram quadro clínico mais grave quando comparado com camundongos imunocompetentes (Tripathi *et al.*, 2017), mostrando mais uma vez o papel da via de interferon no controle de replicação e disseminação desse vírus. Entre os animais infectados, os que receberam cepas da linhagem Africana de ZIKV apresentaram maior perda de peso e mortalidade em comparação com os animais infectados com cepas da linhagem Asiática (Tripathi *et al.*, 2017) demonstrando maior virulência e agressividade da linhagem Africana.

2. JUSTIFICATIVA

Existem grandes diferenças entre a cepa da linhagem africana ZIKV_{MR766} e a cepa da linhagem asiática ZIKV_{PE243}, principalmente referentes a sua virulência, agressividade e capacidade de disseminação. A comparação entre essas diferentes cepas de ZIKV pode esclarecer os mecanismos moleculares associados à doença ou proteção, incluindo a contribuição das diferenças de sequência para virulência, tropismo de tecidos, patologia e evasão imunológica. Nosso grupo tem particular interesse em investigar como esses vírus disseminam para o sistema nervoso central e o papel da replicação viral e resposta a essa infecção por células endoteliais da BBB. Nós demonstramos que ZIKV_{MR766} induziu níveis maiores de IFN- β em HBMECs, em comparação com a cepa asiática ZIKV_{PE243}. Apesar disso, a infecção com ZIKV_{MR766} induziu efeito citopático mais evidente e morte celular em tempos mais tardios da infecção. Ainda, a infecção sistêmica de camundongos com ZIKV_{MR766}, mas não com ZIKV_{PE243}, levou a morte dos animais, associada à ruptura de BBB. Acreditamos que a maior replicação da cepa ZIKV_{MR766} pode estar associada a maior eficiência de escape a resposta a IFN do tipo I. Por outro lado, a resposta exacerbada contra a infecção pode ocasionar lesão tecidual e a maior indução de IFN-I pela infecção da cepa ZIKV_{MR766} em comparação a ZIKV_{PE243} pode ser um dos mecanismos associados a maior virulência dessa cepa. Por isso, aqui investigamos os mecanismos de indução da produção e escape da resposta a IFN do tipo I em HBMECs, buscando compreender os eventos associados a maior virulência da cepa ZIKV_{MR766} em relação a ZIKV_{PE243}. Estudos estão em andamento infectando camundongos com deficiência em IFNAR condicionada ao endotélio, para melhor entendermos o papel desse tecido na proteção ou agravamento da doença. O entendimento do mecanismo de evasão a respostas imunes inatas nos deixa mais perto de escolher um alvo de ação para novos antivirais, podendo assim intervir no curso da doença. É possível que tais descobertas possam ajudar a desvendar estratégias que

podem ser usadas por outros vírus, uma vez que os mecanismos e de evasão as respostas dos hospedeiros são conservados entre flavivírus.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Comparar a eficiência de infecção e a modulação da resposta a IFN do tipo I em HBMECs e modelos animais infectados com as cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766}.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar a cinética e níveis de IFN- β produzidos em HBMEC infectadas com as cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766};
- Comparar cinética e eficiência da replicação viral e quantidade de partículas infecciosas geradas em HBMEC infectadas com as cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766};
- Comparar a capacidade de ligação e entrada das cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} em HBMECs;
- Avaliar a indução de PRR associado a indução da produção de IFN- β nas células infectadas por ambas as cepas;
- Comparar a eficiência no escape a resposta ao IFN- β por ambas as cepas;
- Comparar cinética de replicação viral e quantidade de partículas infecciosas em animais IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} infectados via intracerebroventricular com ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766}
- Comparar níveis de IFN- β produzidos em animais IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} infectados via intracerebroventricular com ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766};
- Comparar a indução de resposta ao IFN- β em animais IFNAR^{+/+} infectados via intracerebroventricular com ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766};

4. MÉTODOS

4.1. Cultura de Células:

As HBMEC (células de endotélio microvascular cerebral humano) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Dennis Grab (The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, EUA). As células foram mantidas em garrafas ou placas TPP em M199 (Medium 199) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e cultivadas a 37°C/5%CO₂. Para todos os experimentos realizados, as HBMECs estavam entre as passagens 25 e 30.

As células VERO (linhagem celular de epitélio de rim de macaco verde africano) foram mantidas em garrafas ou placas Kasvi com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de SFB e cultivadas a 37°C/5%CO₂. Para todos os experimentos realizados, as células VERO estavam entre as passagens 15 e 30.

As células C6/36 (linhagem celular de glândula do mosquito *Aedes albopictus*), foram gentilmente cedidas pela Dra. Andrea T. da Poian (Intituto de Bioquímica Médica- IbqM, UFRJ), foram mantidas em garrafas ou placas Kasvi com meio Leibovitz (L-15 – ThermoFisher) suplementado com de 5% de SFB, 3% de triptose fosfato (ThermoFisher), 7,5% de bicarbonato de sódio (ThermoFisher), 2% de L-glutamina, aminoácidos não essenciais 0,2 mM (ThermoFisher) e cultivadas a 28°C. Para todos os experimentos realizados, as células C6/36 estavam entre as passagens 10 e 20.

4.2. Manutenção dos estoques virais:

Foram utilizadas 2 cepas de ZIKV: A cepa ZIKV_{MR766} (ATCC VR1838), da linhagem africana, isolada de macaco rhesus, gentilmente cedida por Dr. Amilcar Tanuri (Instituto de Biologia, UFRJ), e a cepa ZIKV_{PE243} (KX197192), um isolado clínico humano brasileiro de Pernambuco, gentilmente cedido por Dr. Ernesto T. A. Marques Jr. (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, PE). A propagação viral foi feita em células C6/36, plaqueadas em garrafas de 75 cm² e cultivadas no dia seguinte com as diferentes cepas de ZIKV em moi de 0.01 com meio L-15 sem SFB por 2 horas a 28°C. Outra garrafa foi mantida nas mesmas condições, mas sem adição do vírus. Após esse tempo, foi acrescido 10mL de meio com 2% de SFB. As células serão mantidas assim por 7 dias. Após esse tempo, seu sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 15000rpm por 10 minutos e filtrado em filtro de 0,22µm e posteriormente armazenados à -

80°C. A garrafa mantida sem vírus também teve seu sobrenadante recolhido, centrifugado e filtrado e servirá como mock. O título dos vírus estoques foi determinado por ensaio de placa de lise em células Vero (Coelho *et al.*, 2017) detalhado a seguir.

4.3. Titulação viral por ensaio de plaque:

Células Vero foram plaqueadas em placas de 24 poços com 4×10^4 células por poço com 500µL de meio DMEM com 5% SFB e deixadas overnight para adesão ao poço. No dia seguinte as células foram cultivadas com diluições seriadas das amostras de estoques virais, sobrenadante de HBMECs cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, ou sobrenadante do tecido macerado de camundongos infectados com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} em meio DMEM sem SFB por 2 horas a 37°C. Em seguida os poços foram lavados com PBS para remoção dos vírus não adsorvidos e o meio foi substituído por 1,5mL meio DMEM com 1,5% de carboxi-metil- celulose (CMC) e 1% de SFB. As placas foram incubadas por 5 dias a 37°C e após esse período, as células foram fixadas com adição de 1mL formaldeído 10% nos poços e no dia seguinte, as placas foram lavadas com água corrente para remoção do formaldeído, como descrito anteriormente (Coelho, *et al.*, 2017). Adicionamos 1mL de cristal violeta 1% diluído em metanol a 20%, por 10 min para colorir a células fixadas e após esse tempo lavamos a placa novamente com água corrente para contagem das placas de lise. As placas de lise formadas foram contadas e o resultado será expresso em log de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL). Vale lembrar que em células VERO, utilizadas para titulação do estoque viral e em células C6/36, utilizadas para propagação dos estoques virais, ambos os vírus apresentam cinética de replicação muito semelhante entre si, mesmo em diferentes MOI (Papa *et al.*, 2017).

4.4. Infecção das HBMECs com ZIKV:

As HBMECs foram plaqueadas em placas TPP de 24 poços com 5×10^4 células por poço com 500uL de meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas overnight a 37°C/5%CO₂ para aderência. No dia seguinte, os poços com células foram lavados com Tampão fosfato-salino (PBS) para remoção do SFB, já que as proteínas presentes no soro podem dificultar o processo de adsorção viral, e foram cultivadas com os vírus ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} diluídos em 200µL de meio M199 sem soro, em MOI de 1 (multiplicidade de infecção). Como controle, as células foram cultivadas com mock ou meio de cultura. As placas

foram incubadas por 2h a 4°C, para normalizar a adsorção viral. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS para remoção dos vírus não adsorvidos e foi adicionado meio M199 com 10% soro fetal bovino. Após 0, 2, 16, 24 e 48 horas de infecção, os lisados celulares e sobrenadantes das culturas foram coletados, separadamente, para quantificação de RNA viral por RT-qPCR (lisados e sobrenadante) e de partículas infecciosas por ensaio de plaque (sobrenadante).

4.5. Infecção de camundongos e obtenção de tecidos para análise de carga viral *in vivo*

Os experimentos realizados em modelo murino foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo n° 104/16).

Os camundongos SV129 (WT, IFNAR^{+/+}) e SvA129 (IFNAR^{-/-}) foram mantidos em sistema de ventilação intra-caixa (IVC) em Racks Ventilados (mini-isolador ALESCO) e desmamados 3 semanas após seu nascimento. A partir desse dia seu peso será monitorado diariamente. Quando atingiram peso corporal de 12g, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e inoculados via intracerebroventricular (i.c.v.) (Figueiredo *et al.*, 2013) com Mock, ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} com 2×10^5 PFU/mL por animal (2µL de nosso estoque viral). O peso corporal, alterações fenotípicas e sobrevivência dos animais foram acompanhados, diariamente, por até 4 dias. Parte dos animais foi eutanasiada após 2, 3, e 4 dias de infecção (dpi) para coleta de cérebro para análise da replicação viral e produção de interferon.

Os camundongos foram anestesiados utilizando isoflurano, eutanasiados por deslocamento cervical, e os cérebros e baços foram removidos e mantidos a -80°C até seu processamento. As amostras de cérebro e baço foram pesadas e foi adicionado 1µL de meio RPMI com 1% de gentamicina para cada 0,1mg de tecido. As amostras foram, então, centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos e os sobrenadantes recolhidos e utilizados para extração de RNA ou titulação por plaque.

4.6. Manutenção e processamento do tecido dos animais:

Os cérebros mantidos a -80°C foram macerados. Para isso os órgãos serão pesados e adicionamos $1\mu\text{L}$ de meio RPMI com 1% de gentamicina para cada 0,1mg de tecido. Utilizando um macerador, o tecido foi triturado. Para obtenção do sobrenadante, o microtubo foi centrifugado a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado em outro microtubo para extração de RNA ou para titulação, como descritos será posteriormente.

4.7. Medida de RNA viral por RT-qPCR

As HBMECs foram plaqueadas e cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, como descrito anteriormente. Após 0, 2, 16, 24 e 48 horas de infecção, foram recolhidos o sobrenadante e as células para quantificar o RNA viral. As células, seu sobrenadante recolhido e o sobrenadante do tecido macerado de camundongos infectados com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} passaram pelo processo de extração de RNA utilizando o reagente Trizol (ThermoFisher), seguindo as recomendações do fabricante. Para dosagem do RNA, foi adicionado $1\mu\text{L}$ do RNA total obtido na extração em um Nanodrop (ThermoFisher). Após a dosagem a concentração de RNA extraído das células foi quantificada e normalizada por uma quantidade entre 1-2 μg e a esse volume foi acrescido H_2O purificada para avolumar $7,1\mu\text{L}$. Esse material foi misturado a $2,9\mu\text{L}$ do mix do kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), e colocados no termociclador por 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min e 4°C . Posteriormente, $5\mu\text{L}$ do cDNA obtido foi submetido ao PCR quantitativo (qRT-PCR) para quantificação do RNA utilizando o kit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), usando primers e sonda (IDT) descritos na tabela 1 (Lanciotti *et al.*, 2008), de acordo com recomendação do fabricante. A reação foi realizada no aparelho Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 10 min, 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 concentração equivalente de RNA.

4.8. Análise da expressão de RNAm de IFN- β em células e animais infectados por ZIKV:

As HBMECs foram plaqueadas e cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, como descrito anteriormente. Após 0, 2, 16, 24 e 48 horas de infecção, as células foram recolhidas. Essas células junto com o sobrenadante do tecido macerado de camundongos infectados com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} foram utilizados para quantificar a expressão de RNA de IFN- β por qRT-PCR utilizando o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada no aparelho Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 30 s e 60°C por 1 min, seguido de 95°C 15 s. Para análise da expressão de RNA por qRT-PCR foram utilizados os primers para IFN- β , GAPDH e ISG15 descritos na tabela 1. A quantificação de GAPDH será utilizada como um controle de expressão endógeno celular. Todos os valores obtidos de expressão gênica foram normalizados a partir da divisão pelos valores obtidos de GAPDH e mock por cálculo de $\Delta\Delta CT$.

4.9. Análise de adsorção e entrada viral:

As HBMECs foram plaqueadas como descrito anteriormente e foram resfriadas a 4°C pelo menos 20 minutos na presença de M199 suplementado com SFB a 10% antes da adsorção. As células pré-resfriadas foram lavadas em PBS frio e incubadas a 4 °C e cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, (MOI=1) por 2h como descrito anteriormente. Parte dos poços foi recolhida em seguida para extração de RNA (0h) e outra parte será cultivada por mais 60min a 37°C (1h). Em seguida, os poços foram lavados com PBS e as células foram recolhidas para quantificar o RNA viral por qRT-PCR. As células recolhidas passaram pelo processo de extração de RNA, transcrição reversa e qRT-PCR para dosagem de RNA viral, como descrito anteriormente. Para calcularmos o percentual de internalização, consideramos a quantidade de vírus do tempo de 0h pós infecção como 100% dos vírus ligados a célula e a quantidade de vírus em 1h pós infecção como o total de vírus internalizado. Será feita uma razão entre os dois valores para calcularmos, percentualmente, quanto dos vírus aderidos à célula foram capazes de se internalizarem.

4.10. Análise da expressão de RIG-I e TLR3 por Western Blotting:

As HBMECs foram plaqueadas em placas TPP de 6 poços, na concentração DE 3×10^5 células por poço com 1.5mL de meio M199 suplementado com 10% SFB e deixadas overnight para adesão ao poço. No dia seguinte, as células foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} como descrito anteriormente. Como controle, as células foram cultivadas com mock e meio de cultura. Após 2, 8 e 16 horas de infecção, as células foram recolhidas em tampão de lise (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) com NaCl 150 mM, desoxicolato de sódio a 1%, SDS a 0,1%, Triton X-100 1%) com adição de inibidor de protease 1:500 (Roche Applied Science). O debricit celular foi removido por centrifugação 7500 rpm por 2 min e o sobrenadante foi guardado em -80°C. A concentração das amostras foi normalizada de acordo com a concentração total de proteínas, por método de quantificação por Bradford (Bio-Rad). O lisado celular foi ressuspenso em tampão SDS contendo 2- mercapto-etanol, então aquecidos por 5 min a 95°C, posteriormente foram adicionados volume equivalente a 50 µg de cada amostra em gel de poliacrilamida 10%, seguido de transferência para membrana de Polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon (Millipore). Os marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Bisteca), foram utilizados como padrões. Depois a membrana foi bloqueada com solução de TBS 10% com 5% de soro albumina bovina (BSA-Sigma Aldrich) por 1 hora e foi lavada três vezes com TBS-0,05% de Tween 20 (TBS-T) para a incubação a 4°C overnight no agitador orbital com anticorpos monoclonais de coelho anti-RIG-I e anti-TLR3 (Cell Signaling) diluídos 1:1000 em solução de TBS-T BSA 1%. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS-0,05% de Tween 20 (TBS-T) e depois incubada com anticorpo IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) diluído 1:5000 por 2 horas no agitador orbital. O mesmo processo foi feito para marcação da β-actina, usando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-β-actina diluídos 1:1000 e depois a membrana foi incubada com anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:10000 por 2 horas no agitador orbital. Após marcação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e será revelada utilizando o kit ECL™ Prime Western Blotting System para detecção das proteínas. O nível de expressão de cada receptor foi avaliado a partir da medida das bandas usando o software ImageJ e o cálculo da razão entre RIG-I ou TLR-3 e β-actina (controle de carregamento).

4.11. Avaliação da resistência de ZIKV a IFN-I:

As HBMECs foram plaqueadas em placas TPP de 96 poços com 5×10^3 células por poço, com 200 μ L de meio M199 suplementado com 10% de SFB e deixadas overnight a 37°C para adesão ao poço. No dia seguinte os poços foram lavados com PBS e as células foram tratadas com diferentes concentrações de IFN- β : 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5, 10, 10^2 e 10^3 por 24 horas. Como controle, alguns poços não receberam tratamento com o IFN- β . Após esse tempo, o meio com IFN- β foi removido e foi adicionado um novo meio com os vírus ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} diluídos em 100 μ L meio M199 sem soro, em MOI de 1 por 2h a 4°C para normalizar adsorção viral. Como controle, as células foram cultivadas com mock e meio M199 sem soro. Em seguida o meio contendo vírus foi removido, os poços foram lavados com PBS para remoção dos vírus que não adsorveram às células e depois foi adicionado 200 μ L de meio M199 suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas por 24h a 37°C/5%CO₂. Após esse tempo, seu sobrenadante foi recolhido para quantificação de partículas virais por meio da titulação viral por ensaio de plaque.

4.12. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism. O teste t de Student bicaudal foi usado para calcular a significância entre os grupos onde (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$. Os valores para todas as medições são expressos como média ou média \pm desvio padrão.

Quadro 1: Sequências de primers e sonda utilizados para os ensaios de PCR em tempo real

Primer	Orientação	Sequência
ZIKV 1086	Senso	5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'
ZIKV 1162c	Antisenso	5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'
ZIKV	Sonda	5'-/56FAM/AGCCTACCTTGACAAG CAGTCAGACACTCAA/3BHQ_1/-3'
GAPDH humano	Senso	5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCT-3'
GAPDH humano	Antisenso	5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'
IFN- β humano	Senso	5'-TAGCACTGGCTGGAATGAGA-3'
IFN- β humano	Antisenso	5'-TCCTTGGCCTTCAGGTAATG-3'
GAPDH murino	Senso	5'-CTTTGTCAA GCTCATTCCCTG G-3'
GAPDH murino	Antisenso	5'-TCTTGCTCAGTGTCCCTTGC-3'
IFN- β murino	Senso	5'-GAACATTCGGAAATGTCAGG-3'
IFN- β murino	Antisenso	5'-ACTGTCTGCTGGTGGATGTC-3'
ISG15 murino	Senso	5-AACTGCAGCGAGCCTCTGA-3'
ISG15 murino	Antisenso	5'-CACCTTCTTCTTAAGCGTGTCTACAG-3'

5. RESULTADOS

5.1. ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} apresentam cinética semelhante de replicação em HBMECs.

Dados anteriores demonstraram que a infecção de HBMECs com a cepa ZIKV_{MR766}, mas não com ZIKV_{PE243} induziu efeito citopático e morte celular após 72h de cultura. Além disso, quando camundongos SvA129 eram infectados com ZIKV_{MR766} vieram a óbito, mas os camundongos infectados com ZIKV_{PE243}, não (Papa, *et al.*, 2017; Lucas, *et al.*, 2018). A infecção em HBMECs com ZIKV_{MR766} induzia níveis mais elevados de IFN- β em comparação com ZIKV_{PE243} (Mustafá *et al.*, 2018). Para avaliar os possíveis mecanismos responsáveis pelas diferenças entre as cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766}, como a diferença de indução de expressão de IFN- β , inicialmente, comparamos a eficiência na replicação e a quantidade de partículas infecciosas geradas durante a infecção em células HBMEC.

Para manter a multiplicidade de infecção utilizada nos experimentos anteriores, mas normalizar a etapa de adsorção viral, as células foram inoculadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} por 2h a 4°C. Após 0, 2, 16, 24 e 48 horas de infecção, foram recolhidos o sobrenadante e as células para dosagem do RNA viral por qRT-PCR. Ambas as cepas apresentaram níveis de RNA intracelular e extracelular semelhantes ao longo do tempo (Figura 5A). Curiosamente, níveis ligeiramente maiores de RNA liberado no sobrenadante foram observados quando as células eram infectadas com a cepa ZIKV_{PE243}, em relação a cepa ZIKV_{MR766} (Figura 5C). No entanto, quando esses valores foram normalizados de acordo com o “input”, calculando-se a razão entre o número de cópias obtido em cada tempo de coleta por aquele detectado em 0 hpi (fold induction), detectamos um pequeno aumento no número de cópias de RNA intracelular de ZIKV_{MR766}, em relação a ZIKV_{PE243} (Figura 5B) e um aumento de 5 vezes na concentração de RNA extracelular de ZIKV_{MR766}.

Para avaliar a cinética de produção de partículas infecciosas fizemos a titulação viral por um ensaio de plaque, como descrito em métodos. Observamos que o título de partículas infecciosas (PFU/ml) liberadas por HBMECs infectadas por ambos os isolados era semelhante nas primeiras horas de infecção (Figura 5E). No entanto, a partir de 24 horas, foram observados títulos maiores nas culturas infectadas com ZIKV_{MR766} em relação a ZIKV_{PE243}. Interessantemente, quando esses valores foram normalizados de acordo com o “input”, notamos um aumento de 100x nos valores de PFU produzidas após a infecção com ZIKV_{MR766} em relação a ZIKV_{PE243}, após 24 horas de infecção (Figura 5F). Esses dados indicam maior eficiência de replicação e produção de partículas infecciosas da cepa ZIKV_{MR766}, o que explica a maior

citotoxicidade e morte celular observada após 48 horas de infecção nas HBMECs cultivadas com o ZIKV_{MR766} quando comparado com ZIKV_{PE243} (Papa *et al.*, 2017). É importante notar, ainda, que a diferença observada na concentração de PFU é muito maior do que aquela detectada em relação ao número de cópias de RNA, o que pode estar relacionado ao escape de mecanismos antivirais intracelulares, permitindo maior eficiência na maturação viral. A maior eficiência de replicação da cepa ZIKV_{MR766} pode estar associada, ainda, a maior letalidade dessa cepa em modelos experimental de infecção murina.

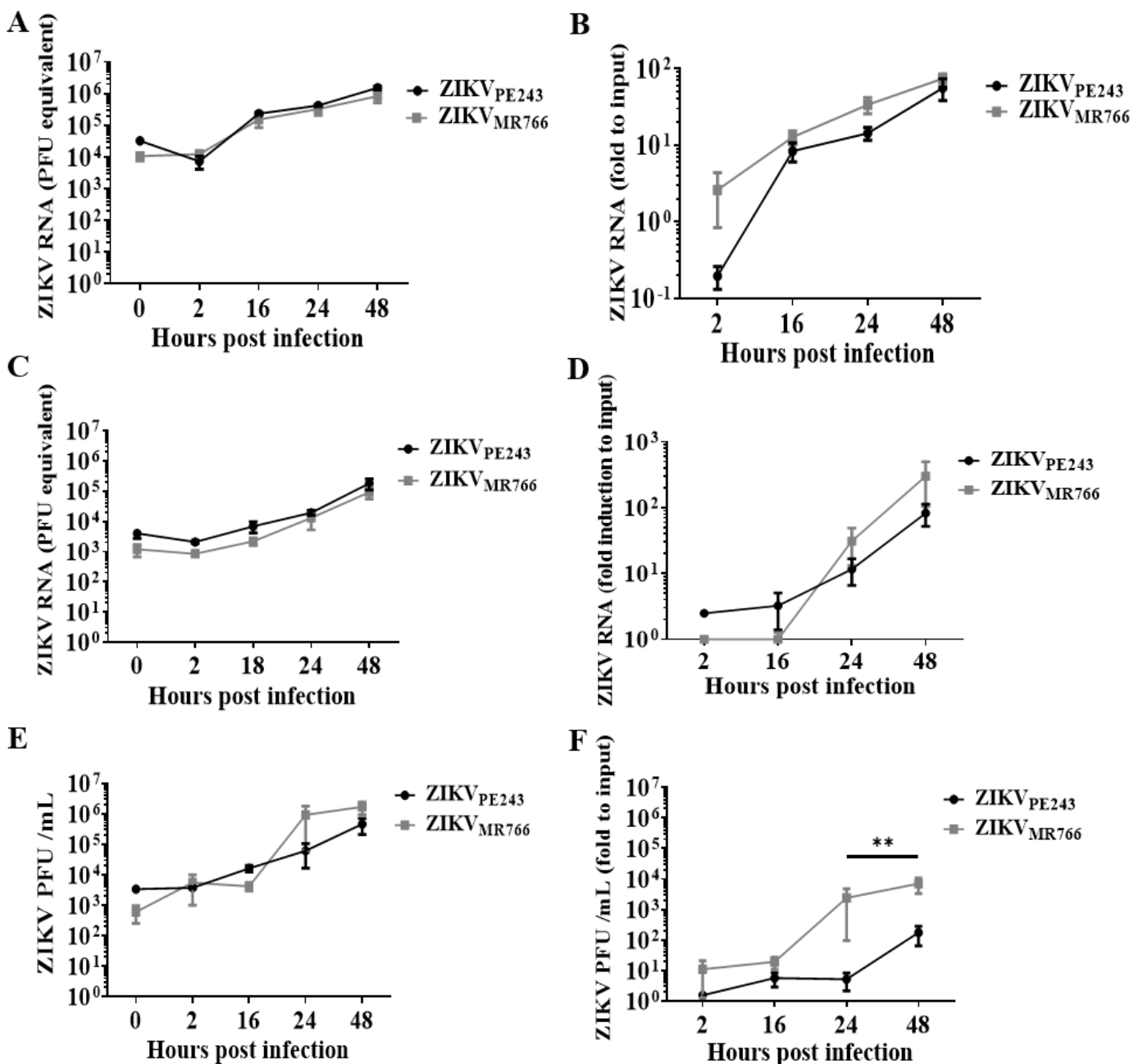


Figura 5: HBMECs foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} por 2h/4°C para adsorção. Em seguida, o meio foi substituído por meio completo e as células foram mantidas por diferentes períodos de tempo. A concentração de RNA viral nas células (A) e sobrenadantes (C) foram avaliados por qRT-PCR (n=4). A concentração de RNA viral nas células e sobrenadante foi normalizada por Fold Induction (B e D). A concentração de partículas infecciosas liberadas foi avaliada por ensaio de plaque em células VERO (n=4) (E) e normalizada por Fold Induction (F). Os dados foram analisados pelo teste T de Student. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

5.2. ZIKV_{MR766} possui maior eficiência de entrada em HBMEC que ZIKV_{PE243}.

Apesar de ambas as cepas apresentarem uma cinética semelhante de replicação, observamos que a cepa ZIKV_{PE243} apresentou maior valor de input ou concentração de RNA e partículas infecciosas logo após adsorção em todos os experimentos realizados, enquanto que ZIKV_{MR766} apresentava títulos virais maiores nos períodos mais tardios.

A adsorção do vírus à superfície da célula hospedeira e sua internalização são essenciais para o início da infecção viral e podem ser relevantes para a maior indução de IFN- β observado quando as células foram infectadas com a cepa ZIKV_{MR766}. Estudos anteriores demonstram que é possível que haja diferença na capacidade de adsorção e entrada viral entre cepas de diferentes linhagens de ZIKV (Bos *et al.*, 2018).

Para investigar se as cepas ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766} possuem diferença na capacidade de adsorção e entrada viral em HBMECs, essas células foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} a 4°C por 2h para avaliar adsorção. Em seguida, parte das células foi imediatamente coletada (0 hpi), e outra parte foi incubada a 37°C e mantidas por mais 60 minutos para avaliar entrada viral (1 hpi). Nós observamos maior concentração de RNA viral no tempo 0h nas células infectadas com ZIKV_{PE243}, em relação as células infectadas com ZIKV_{MR766}, sugerindo que a primeira tem uma maior capacidade de ligação as HBMEC (Figura 6A). Porém, ao observarmos o tempo de 1 hora pós infecção notamos que essa diferença entre as cepas é nula, o que indica maior eficiência de entrada do isolado ZIKV_{MR766}. Para quantificarmos esse dado, consideramos a quantidade de RNA viral dosada após adsorção (0hpi) como 100% e calculamos o percentual de RNA pós entrada (1hpi). De fato, foi observado que ZIKV_{MR766} possui maior eficiência de internalização em células HBMEC quando comparado com ZIKV_{PE243} (Figura 6B), o que pode estar associado a maior ou mais rápida disponibilidade de RNA viral para sensibilização de sensores intracelulares.

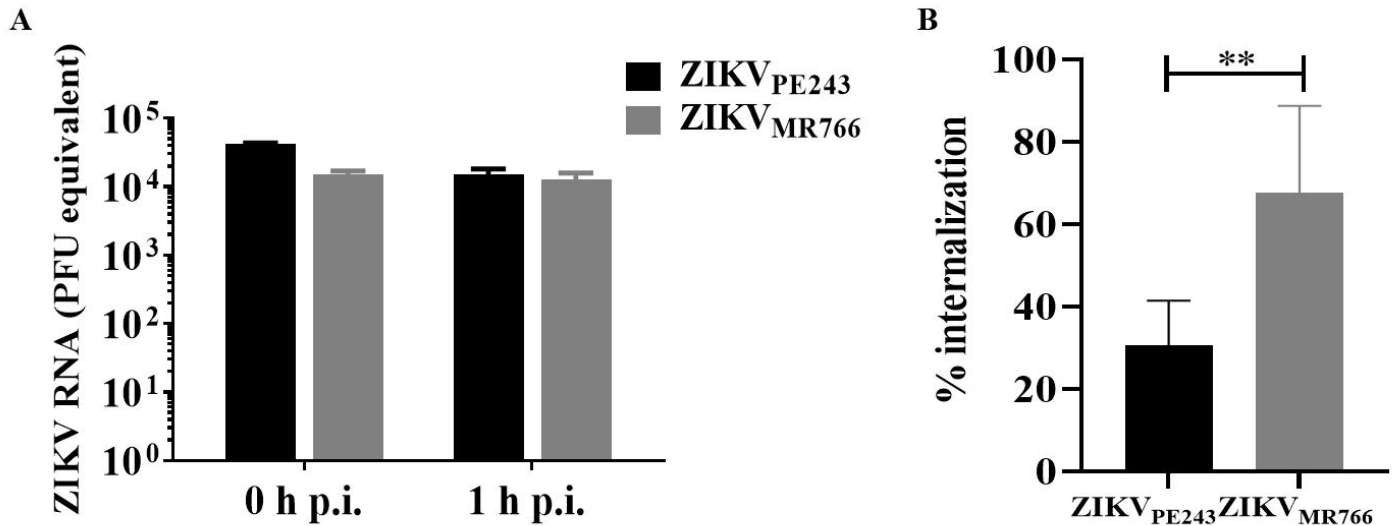


Figura 6: HBMECs foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} por 2h/4°C para adsorção. Em seguida, o meio foi substituído por meio completo e as células foram mantidas por diferentes por 0 e 1 hora. A concentração de RNA viral nas células (A) foi avaliada por qRT-PCR (representativo de n=3). (B) Razão entre a quantidade de vírus internalizado nas células é vírus aderidos, mostrando o percentual de vírus capaz de se internalizar. Os dados foram analisados pelo teste T de Student. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, onde valor de $p = 1.396$.

5.3. ZIKV_{MR766} induz maior expressão de TLR3 do que ZIKV_{PE243}.

Para avaliar os mecanismos associados a maior indução de IFN- β por ZIKV_{MR766}, investigamos a expressão dos sensores intracelulares de RNA de RIG-I e TLR3 nas HBMECs infectadas com ambas as cepas. Para isso HBMECs foram plaqueadas e cultivadas com ZIKV_{MR766} ou ZIKV_{PE243} por 2h/4°C para adsorção. Em seguida, o meio com vírus não adsorvido, foi substituído por meio completo. As células foram recolhidas 2, 8 e 16 horas após a infecção para quantificar, por Western Blotting, a expressão de TLR3 e RIG-I induzida pela infecção.

Nas figuras 7A e B podemos observar que não houve diferença na expressão de RIG-I induzido pela infecção pelas diferentes cepas de ZIKV. Por outro lado, observamos um aumento de expressão de TLR3 após 16h de infecção com ZIKV_{MR766} em relação a infecção com ZIKV_{PE243}. A maior expressão de TLR3 a partir das 16 horas de infecção por ZIKV_{MR766} coincide com o

início da expressão de IFN- β pela mesma cepa no mesmo ponto da infecção (Mustafá *et al.*, 2018).

Esses dados sugerem que há um reconhecimento mais rápido ou mais eficiente do RNA de ZIKV_{MR766}, possivelmente, devido a maior disponibilidade de determinada estrutura ou conformação de RNA dessa cepa especificamente. Alternativamente, é possível que a própria produção de IFN- β tenha induzido maior expressão de TLR3, embora o mesmo não tenha sido observado com relação a RIG-I. Vale ressaltar, no entanto, que o experimento foi feito uma única vez e precisa ser repetido para confirmação dos dados. Ainda, a importância desses receptores para a produção de IFN- β será avaliada após silenciamento dos mesmos e dosagem da citocina.

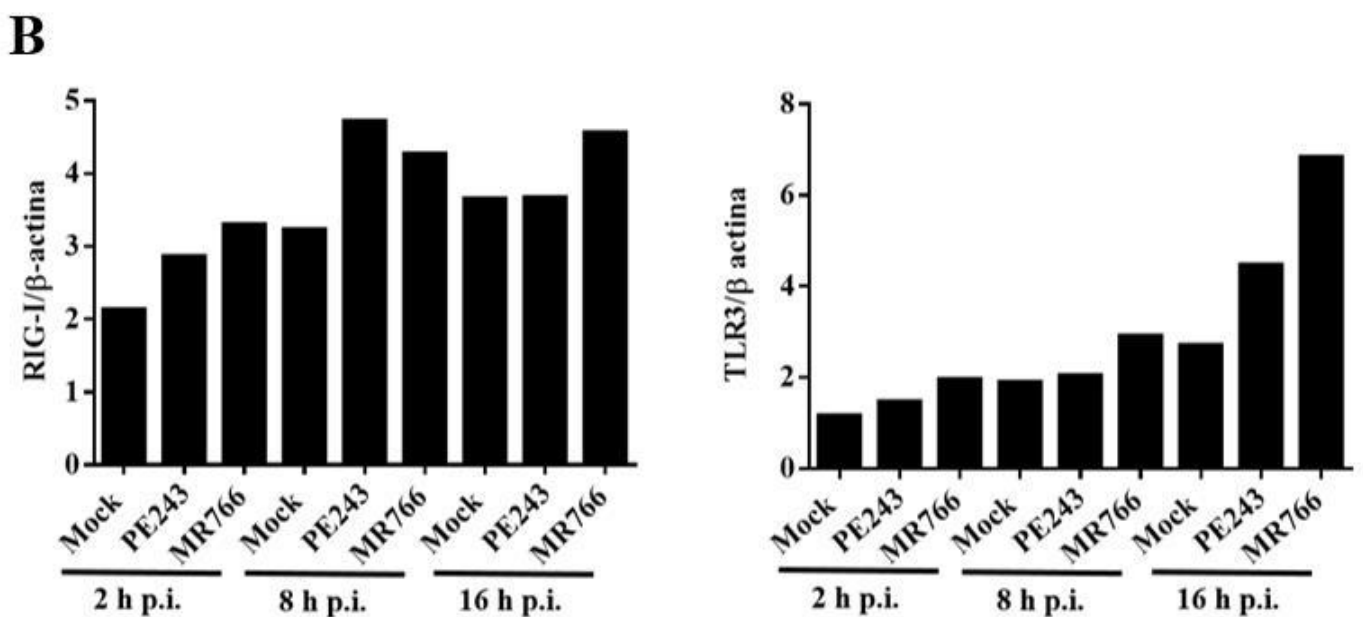
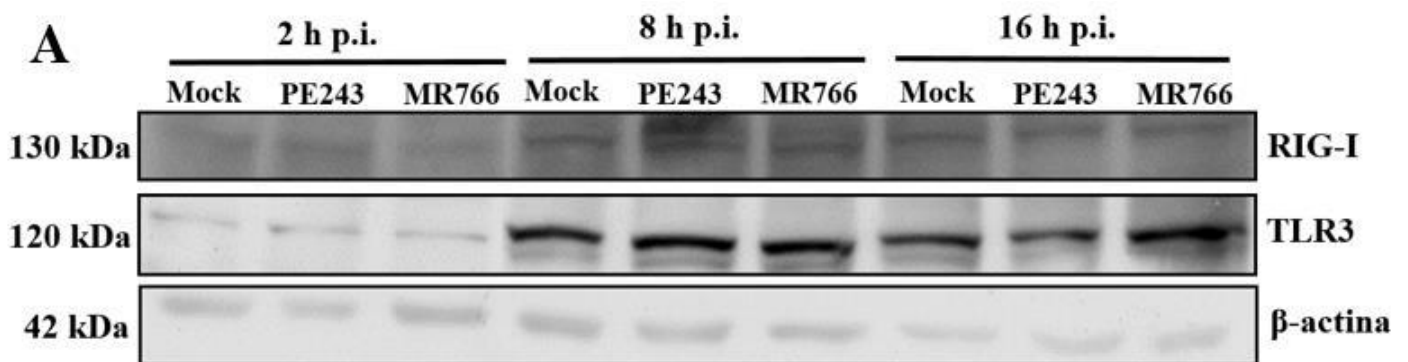


Figura 7: HBMECs foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} por 2h/4°C para adsorção. Em seguida, o meio foi substituído por meio completo. A expressão de RIG-I e TLR-3 foi avaliada por Western Blotting. (A) Marcação dos receptores e (B) sua quantificação normalizando pela β -actina usando o software ImageJ. (n=1).

5.4. ZIKV_{MR766} induz maiores níveis de RNAm de IFN- β que ZIKV_{PE243}.

Anteriormente, observamos que a infecção em HBMECs com ZIKV_{MR766} induzia níveis elevados de IFN- β , a partir de 16 horas pós infecção enquanto ZIKV_{PE243} induziu níveis mais elevados somente a partir de 24 horas pós infecção (Mustafá *et al.*, 2018). Nesses experimentos, a etapa de adsorção não foi normalizada. Como observamos maior capacidade de ZIKV_{MR766} invadir as HBMECs e produzir partículas infecciosas, nos perguntamos se ao normalizar a adsorção teríamos diferença no momento ou níveis de indução de produção de interferon por essas cepas.

Para normalizar a etapa de adsorção, as HBMEC foram plaqueadas e inoculadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} ou mock por 2h a 4°C. Após 0, 2, 16, 24 e 48 horas de infecção, as células foram recolhidas para quantificação do RNAm de IFN- β por qRT-PCR e GAPDH como controle de expressão endógeno celular. Os valores de expressão gênica obtidos através dessa qRT-PCR foram normalizados a partir da divisão pelos valores obtidos de GAPDH e mock por cálculo de $\Delta\Delta CT$.

Como resultado, podemos confirmar que a partir de 16 horas após a infecção, ambas as cepas tiveram o maior nível de indução de produção de IFN- β e, como observado anteriormente, a infecção com ZIKV_{MR766} induziu níveis até 5 vezes maiores de RNAm de IFN- β quando comparado com a cepa ZIKV_{PE243}. Com isso, confirmamos essa maior indução de IFN- β causada por ZIKV_{MR766} em comparação ao ZIKV_{PE243}.

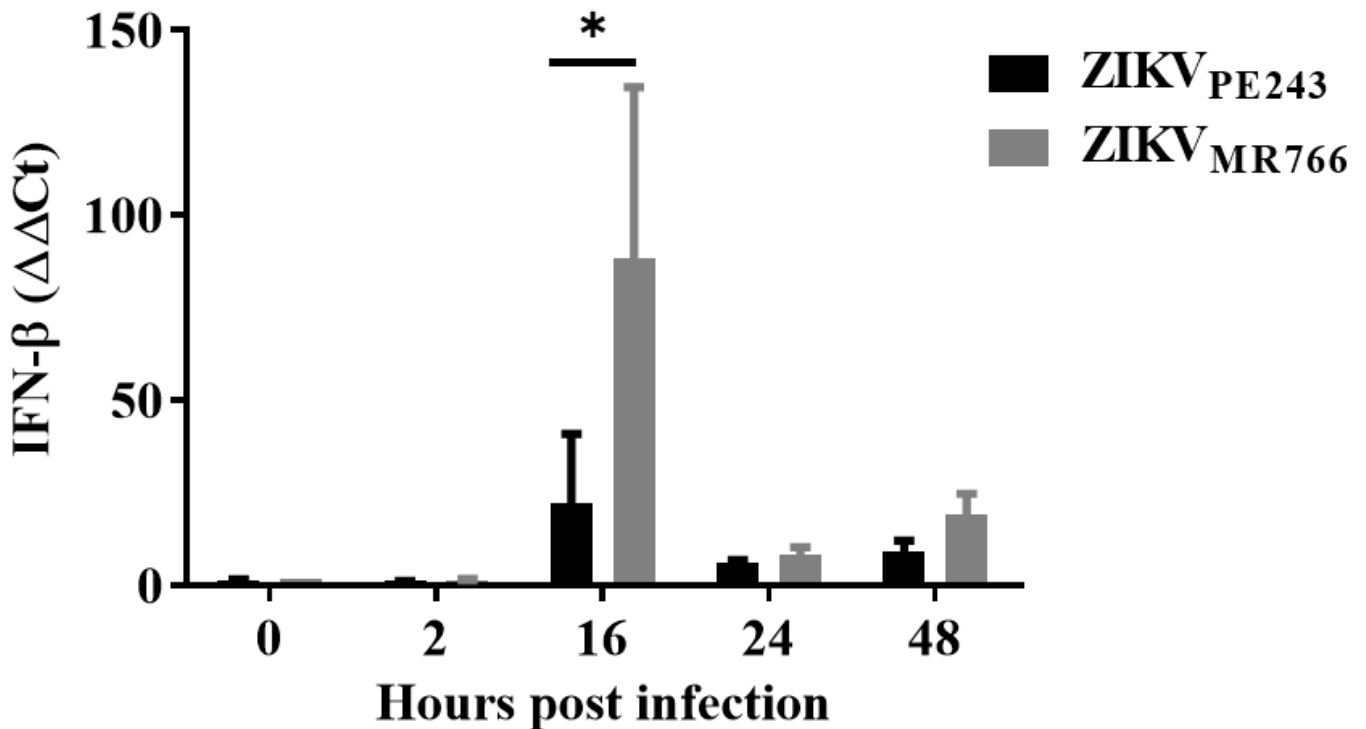


Figura 8: (A) HBMECs foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} por 2h/4°C para adsorção. Em seguida, o meio foi substituído por meio completo a expressão de mRNA correspondente a IFN-β foi avaliada por qRT-PCR 2, 16, 24 e 48h p.i. Figura mostra resultado de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas (n=6).

5.5. ZIKV_{MR766} é mais resistente ao IFN-I do que ZIKV_{PE243}

Nós observamos que ZIKV_{MR766} promoveu uma expressão maior e mais rápida de IFN em comparação à cepa ZIKV_{PE243}. Ainda assim, ZIKV_{MR766} apresenta níveis mais elevados de replicação, produção de partículas infecciosas e citotoxicidade, quando comparado com ZIKV_{PE243}, mostrando que o vírus replica mesmo na presença de níveis aumentados de IFN, indicando que ZIKV_{MR766} seja capaz escapar ou resistir aos efeitos do IFN-β de forma mais eficiente que ZIKV_{PE243}.

Para comparar a resistência a IFN entre as cepas ZIKV_{MR766} e ZIKV_{PE243}, avaliamos os níveis de replicação viral de cada cepa na presença de diferentes concentrações de IFN-β. O tratamento com IFN-β é feito antes da infecção, pois dados prévios mostram que HBMECs infectadas com

ZIKV bloqueiam as respostas ao IFN, no entanto, são inibidas quando as células são tratadas 24h antes da infecção (Mustafá *et al.*, 2018).

Para isso determinarmos o IC₅₀ de IFN-β: As células HBMEC foram plaqueadas e tratadas com as seguintes concentrações de IFN-β: 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 1, 5, 10, 10² e 10³, por 24 horas. Após esse tempo as células foram cultivadas com ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766}, sendo a etapa de adsorção normalizada como descrito anteriormente. 24 horas após a infecção, o sobrenadante das HBMECs foi recolhido e a concentração de partículas infecciosas liberadas foi avaliada por ensaio de plaque como descrito em métodos.

Nós observamos que seria necessária a concentração de 0.14 U/ml de IFN-β para inibir em 50% a replicação do ZIKV_{PE243} (Figura 9A), enquanto para inibir a replicação do ZIKV_{MR766} em 50%, são necessárias 2.54 U/ml de IFN-β (Figura 9B), uma concentração 20 vezes maior. Então podemos dizer que ZIKV_{MR766} é 20 vezes mais resistente aos efeitos do IFN-β quando comparado com a cepa ZIKV_{PE243}. Esse achado pode explicar como a cepa ZIKV_{MR766} induz maiores níveis de IFN-β durante as infecções em HBMECs e ainda assim ser capaz de replicar ligeiramente mais eficientemente, além de causar maior efeito citopático, quando comparado com ZIKV_{PE243}.

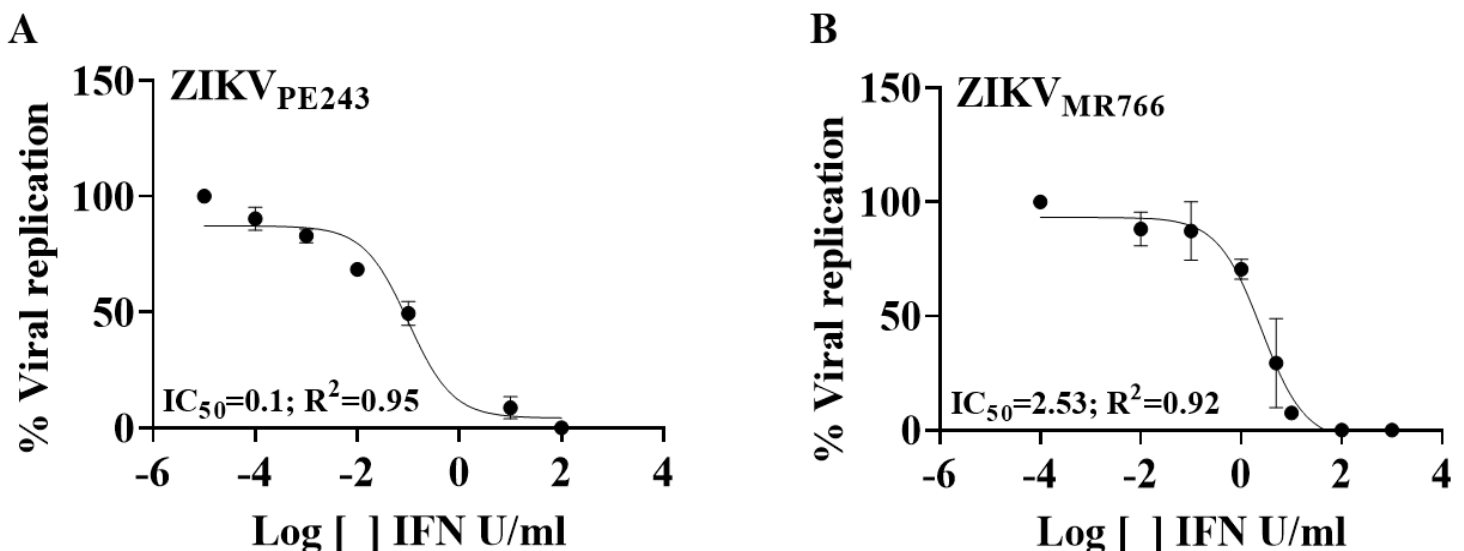


Figura 9: HBMECs foram tratadas com diferentes concentrações IFN-β por 24h. Em seguida, as células foram infectadas com (A) ZIKV_{PE243} ou (B) ZIKV_{MR766}. Seus sobrenadantes foram recolhidos 24h p.i., e titulados em células VERO. O IC₅₀ foi avaliado utilizando prisma. (n=4).

5.6. Produção e resposta a interferons do tipo I não impede a replicação de ZIKV_{MR766}, mas protege contra infecção letal em modelos experimentais murinos

Para comparar o efeito da infecção *in vivo* de ambas as cepas na presença ou ausência de resposta aos interferons do tipo I, foram utilizadas duas linhagens de camundongos: (i) camundongos da linhagem parental selvagem Sv129 expressam os receptores de IFN (IFNAR^{+/+}) e são responsivos a tais citocinas; (ii) camundongos SvA129 não expressam receptores para IFN do tipo I (IFNAR^{-/-}), sendo, portanto, não responsivos a tal estímulo. Com base no modelo experimental descrito pelo grupo anteriormente, no qual foi induzida letalidade por ZIKV_{MR766}, mas não por ZIKV_{PE243} (Lucas, et al., 2018), os animais foram infectados com 4 semanas de idade. Diferente desse modelo, no entanto, aqui realizamos inoculação intracerebroventricular (i.c.v.), com o objetivo de avaliar exclusivamente o impacto do IFN na replicação de células do SNC e BBB, sem a interferência dos diferentes níveis proteção sistêmica induzido por cada cepa, observados anteriormente.

A sobrevivência, fenótipo e peso corporal de cada animal foi monitorado, diariamente, até 4 dias, quando todos os camundongos IFNAR^{-/-} inoculados com ZIKV_{MR766} foram a óbito ou foram eutanasiados por perda de mais 20% da massa corporal (Figura 10A). No terceiro dia pós infecção, alguns animais dos animais inoculados com ZIKV_{MR766} apresentaram pelos arrepiados na região da nuca e costas e também apresentaram vermelhidão na região abdominal e patas. 5% de animais vieram a óbito no terceiro dia pós infecção. Pouco antes de virem a óbito, esses animais apresentavam sinais de danos neurológicos, com comportamento agitado, correndo em círculos, pulando ou batendo nas paredes da caixa ventiladora. Os animais que não vieram a óbito (mas foram eutanasiados por perda de peso) apresentavam comportamento apático, não tentavam fugir ao serem pegos para eutanásia ou sequer emitiam sons. Nenhum camundongo infectado com ZIKV_{PE243} morreu nesse período.

Avaliação da massa corporal demonstrou que os camundongos inoculados com Mock ou ZIKV_{PE243} ganharam peso gradualmente durante o tempo que foram acompanhados até a eutanásia, porém os animais inoculados com ZIKV_{MR766} ganharam peso somente até o segundo

dia pós infecção e a partir do terceiro dia, parte dos animais apresentaram uma leve, porém significativa perda de peso, que foi mais acentuada no quarto dia pós infecção (Figura 10B).

Já os camundongos Sv129 ganharam peso normalmente e não apresentaram nenhum sinal clínico de doença ou abatimento até o dia da eutanásia independente do vírus inoculado. Nenhum animal Sv129 veio a óbito durante o tempo observado (Figura 10C-D).

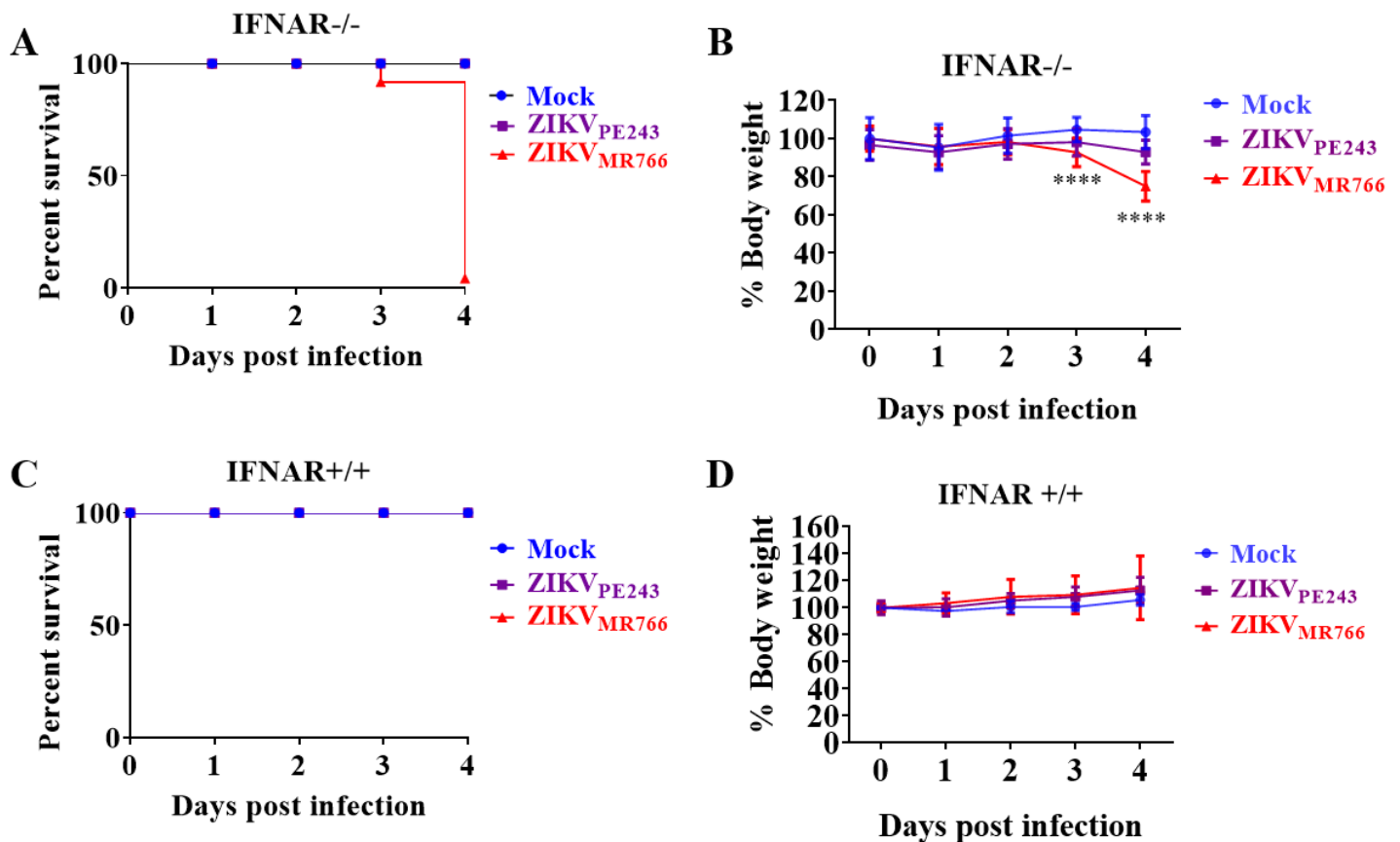


Figura 10: Camundongos SvA129 (IFNAR^{-/-}) (A e B) E Sv129 (IFNAR^{+/+}) (C e D) infectados com Mock, ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} via intracerebroventricular tiveram sua sobrevivência (A e C) e peso corporal (B e D) monitorados até 4d p.i. (Sv129: n=15; SvA129: n=25). Os dados foram analisados pelo teste T de Student. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Em seguida, avaliamos a carga viral em cada um desses modelos animais, infectados com ambas as cepas de ZIKV. Os camundongos Sv129 (IFNAR^{+/+}) e SvA129 (IFNAR^{-/-}) foram inoculados via i.c.v. com Mock, ZIKV_{MR766} ou ZIKV_{PE243}, eutanasiados 2, 3 e 4 dias pós infecção, e os cérebros coletados. As medidas de RNA viral e partículas infecciosas foram feitas por qRT-PCR e ensaio de plaque, respectivamente e normalizadas pela massa dos tecidos.

Surpreendentemente, altos níveis de RNA viral foram detectados nos cérebros tanto de camundongos IFNAR^{-/-} (Figura 11A), como IFNAR^{+/+} (Figura 11B), sugerindo que a resposta a IFNs do tipo I não é suficiente para impedir o estabelecimento da infecção, pelo menos quando o inóculo é intracerebral. Níveis ligeiramente aumentados, mas não significativos, de RNA foram detectados após inoculação com ZIKV_{MR766}, em relação a ZIKV_{PE243} em ambas as modelos murinos.

Por outro lado, diferenças importantes foram observadas quando analisamos a produção de partículas infecciosas. Como esperado, nos animais SvA129 (IFNAR^{-/-}), ambas as cepas produziram partículas infecciosas desde o segundo dia pós infecção (Figura 11C), porém a cepa ZIKV_{MR766} gerou até 100x mais partículas quando comparado com a cepa ZIKV_{PE243}. Esses dados estão de acordo com os estudos baseados em inoculação sistêmica realizados anteriormente (Lucas, et al., 2018). Em camundongos Sv129 (IFNAR^{+/+}), notamos que, apenas a cepa ZIKV_{MR766} foi capaz de produzir partículas infecciosas desde o segundo dia pós infecção (Figura 11D) enquanto a cepa ZIKV_{PE243} foi capaz de produzir partículas infecciosas apenas a partir do quarto dia pós infecção e ainda assim em títulos significativamente inferiores a cepa ZIKV_{MR766}, sugerindo escape de ZIKV_{MR766} a resposta antiviral mediada por IFN.

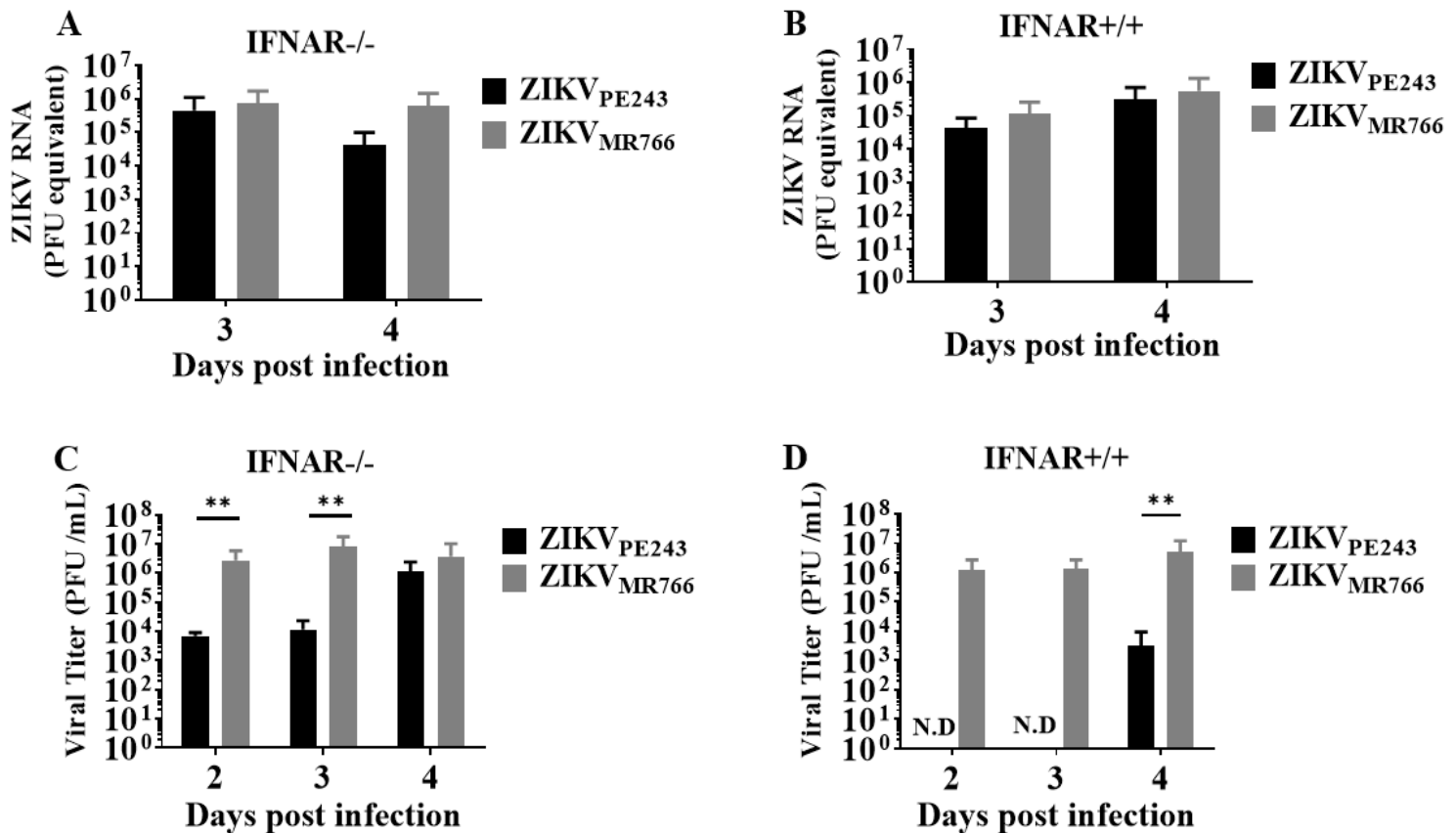


Figura 11: Camundongos SvA129 (A e C) e Sv129 (B e D) infectados com Mock, ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} via intracerebroventricular foram eutanasiados 2, 3 ou 4d p.i. e tiveram cérebro recolhidos para quantificação carga viral por qRT-PCR (A e B) ou ensaio de plaque (C e D). (n=6). Os dados foram analisados pelo teste T de Student. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Para suportar a hipótese de escape a IFN do tipo I, precisávamos confirmar se a infecção *in vivo*, de fato, induzia produção e resposta a IFN no modelo de camundongo IFNAR^{+/+}, tal qual previamente observado *in vitro*. Para tal, a expressão de IFN- β e ISG15 foi investigada nas amostras de tecido cerebral por RT-qPCR. Nós observamos que a infecção por ambas as cepas induz produção de IFN- β , com níveis significativamente maiores nos cérebros dos animais infectados com ZIKV_{MR766} (Figura 12A e B). De forma semelhante, a expressão de ISG15 foi também detectada após inoculação por ambas as cepas e significativamente mais elevada nos animais inoculados com ZIKV_{MR766} (Figura 12C), indicando que, de fato, houve indução da produção e da resposta a IFN do tipo I nesses animais. Ainda, os dados corroboram os estudos *in vitro* de maior indução de IFN por ZIKV_{MR766}. Vale ressaltar que não detectamos diferenças entre amplificação do IFN- β em qRT-PCR entre animais IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} inoculados com mock.

O conjunto dos dados *in vivo* indica que a cepa ZIKV_{MR766} replica com mais eficiência no SNC, induzindo maior produção e resposta a IFN do tipo I. A resposta antiviral induzida por essas citocinas não foi suficiente para inibir a replicação viral, no entanto, protegeu os animais das manifestações neurológicas e letalidade. Experimentos em andamento, a respeito da integridade da BBB e do infiltrado inflamatório estão em andamento para esclarecer o papel específico da resposta a IFN nesse compartimento na neuropatologia da Zika.

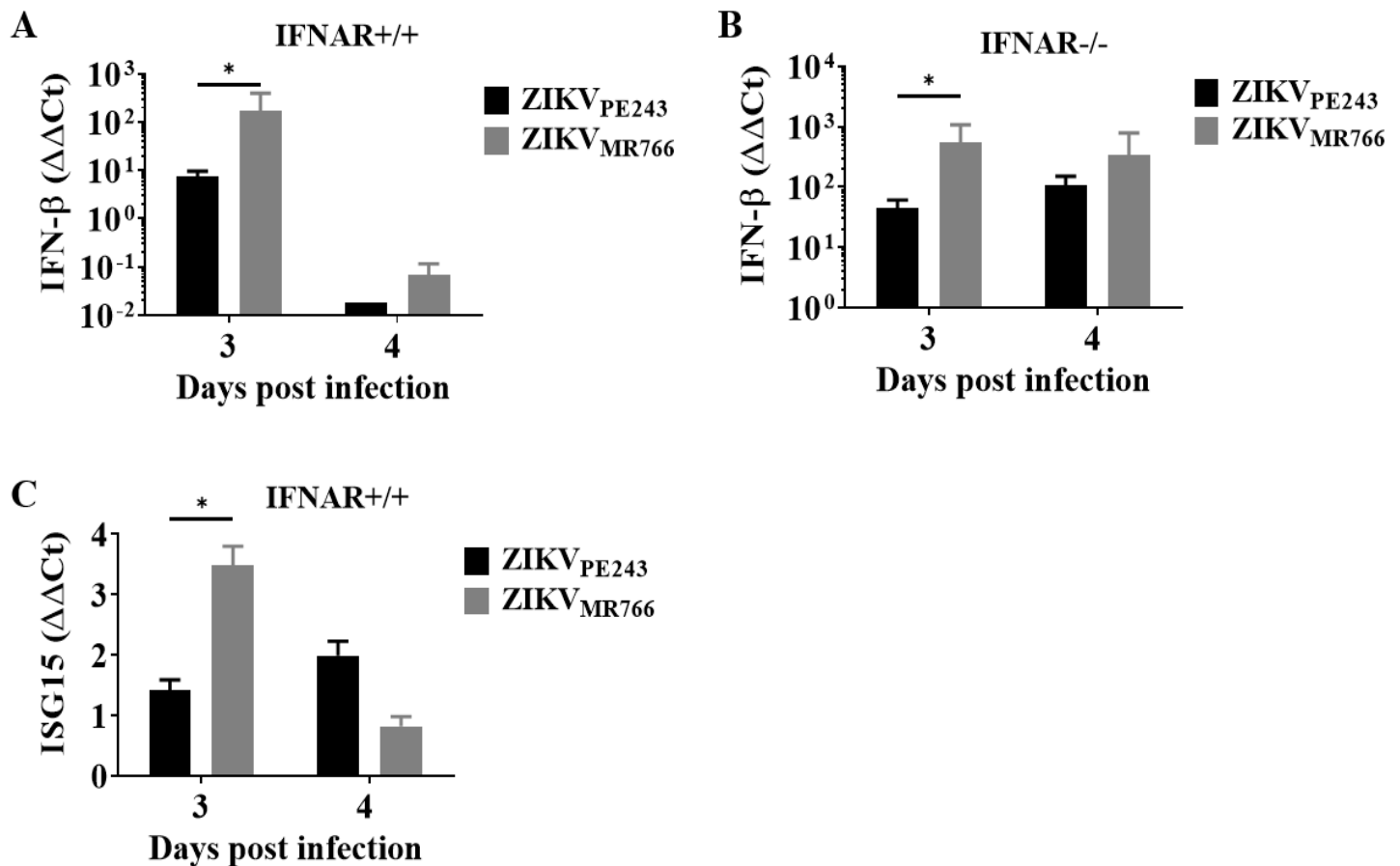


Figura 12: Camundongos Sv129 (A e C) e SvA129 (B) infectados com Mock, ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} via intracerebroventricular foram eutanasiados 3 ou 4d p.i. e tiveram cérebro recolhidos para quantificação da indução de produção de IFN-β e ISG15 em resposta a infecção por qRT-PCR. (n=2). Os dados foram analisados pelo teste T de Student. * p < 0,05; ** p < 0,01.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós avaliamos a produção, resposta, e escape ao IFN- β , induzidos em HBMECs, por duas cepas de ZIKV, representantes das linhagens africana e asiática (ZIKV_{MR766} e ZIKV_{PE243}). Dados anteriores gerados por nosso grupo já haviam demonstrado que a infecção de HBMEC com ZIKV_{MR766} induzia maior efeito citopático (CPE) do que a infecção com ZIKV_{PE243}, embora a cinética e eficiência de replicação viral fosse semelhante. Contra intuitivamente, a cepa MR766 também promovia uma expressão mais rápida e mais elevada de IFN- β (Papa, et al., 2017). Esses resultados nos levaram a hipótese de que ZIKV_{MR766} poderia escapar com mais eficiência dos efeitos antivirais de IFN ou que o IFN produzido contribuísse para o CPE observado. Essas hipóteses foram então avaliadas, ainda utilizando o modelo de HBMECs.

HBMECs são uma linhagem de células endoteliais microvasculares cerebrais humanas, que tem sido utilizadas como modelo de endotélio de barreira hematoencefálica, *in vitro*, em diferentes modelos (Stins *et al.*, 2001 e Grab, *et al.*, 2009). A escolha desse modelo celular foi motivada por sabermos que o ZIKV foi detectado no tecido cerebral e líquido cefalorraquidiano de fetos com microcefalia, indicando que seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) e atingir o SNC (Mlakar, *et al.*, 2016). Alguns flavivirus podem atravessar a BBB associados a leucócitos infectados ou por infecção direta ou sistêmica de células da barreira, causando inflamação e consequente ativação de células imunes que afetam a permeabilidade da barreira através da liberação de mediadores inflamatórios (Mustafá, *et al.*, 2019). Sabemos também que ZIKV é capaz de infectar essas células, sem induzir efeito citopático e que sua infecção em HBMECs resulta na liberação de ZIKV das superfícies apicais e basolaterais, sendo esse o potencial mecanismo para o ZIKV cruzar a BBB e atingir o SNC (Mladinich, et al., 2017; Papa, *et al.*, 2017).

Antes de iniciarmos os ensaios para avaliar o escape das cepas virais ao IFN, optamos por repetir alguns dos ensaios realizados anteriormente, incluindo replicação viral e medida da produção de IFN- β , mas agora buscando uma melhor normalização dos ensaios, já que objetivo seria comparar as respostas as duas cepas. Os experimentos anteriores foram feitos fazendo a infecção com MOI de 1. Uma possível estratégia para normalizar a infecção entre as duas cepas seria utilizarmos MOIs mais altos na infecção, visando a infecção síncrona de todas as células na cultura. Por outro lado, alteração de MOI poderia levar a outras variáveis em relação aos experimentos anteriores, impedindo, por exemplo, a observação do efeito parácrino antiviral do

IFN. Assim, optamos por fazer essa normalização, realizando a etapa de adsorção a 4°C, de modo a, pelo menos sincronizar o momento de internalização viral, ainda que apenas parte das células da cultura seja infectada nesse primeiro ciclo, já que 35% das HBMECs são infectadas com ZIKV_{MR766} até 72h p.i. enquanto somente 20% das HBMECs foram infectadas com ZIKV_{PE243} no mesmo período pós infecção (Papa, *et al.*, 2017).

Após normalização da adsorção viral fizemos algumas observações em relação a cinética e eficiência da replicação. A cepa ZIKV_{PE234} foi ligeiramente mais eficiente ao se ligar a superfície celular, porém após 1h de incubação a 37⁰ para permitir a entrada das partículas, os níveis de RNA intracelulares eram semelhantes entre as duas cepas. O cálculo de percentual de entrada em relação a adsorção (1hpi/0hpi) revelou que a cepa ZIKV_{MR766} era mais eficiente nesse processo. Medida do número de cópias de RNA viral em períodos subsequentes sugeriu que, após a entrada, ambas as cepas possuem cinética semelhante de replicação. Interessantemente, no entanto, a produção de partículas infecciosas foi de até 1000 vezes maior em HBMECs infectadas com ZIKV_{MR766}, em relação as infectadas com ZIKV_{PE243}, sugerindo maior eficiência de maturação ou escape de fatores de restrição ou mediadores antivirais endógenos. De fato, em períodos mais tardios, a concentração de RNA viral intra ou extracelular nas culturas de HBMECs infectadas com ZIKV_{MR766} também era maior, o que deve ser reflexo de sucessivos ciclos após a liberação de mais partículas infecciosas.

Tal qual detectado anteriormente, a produção de IFN-β induzida por ZIKV_{MR766} foi maior do que aquela induzida por ZIKV_{PE243} e foi detectada a partir de 16hpi. Nesse mesmo tempo, detectamos um aumento na expressão de TLR-3, o que pode indicar que há maior atividade de reconhecimento e sinalização por esse sensor, possivelmente responsável pela maior produção de IFN-β apenas nas culturas infectadas com ZIKV_{MR766}. Hamel, et al.,2015 demonstrou que a cepa PF-25013-18 um isolado clínico da Polinésia Francesa, e pertencente a linhagem asiática, induziu aumento na expressão de TLR3, RIG-I entre outros receptores em fibroblastos, mas somente em tempos posteriores a 24h p.i., tornando necessária a investigação do aumento da expressão desses receptores em tempos posteriores ao observados neste projeto.

Para investigar o papel desses sensores na indução da produção de IFN, pretendemos silenciá-los por técnica de RNA de interferência e, então, dosar a expressão da citocina e dos genes estimulados por IFN (ISGs). A padronização desses ensaios já está em andamento

Alternativamente, a maior expressão de TLR3 pode ser consequência da maior produção de interferon induzida pelo vírus, uma vez que já foi demonstrado que sua expressão pode ser

positivamente modulada por IFN- β e IFN- α (Lee, et al., 2019; Tissari, et al., 2005; revisado por Schneider et al., 2014). Embora ainda não possamos responder se o aumento da expressão de TLR3 é causa ou consequência da maior produção de IFN- β , acreditamos que haja maior sinalização intracelular disparada pelo mesmo, uma vez que dados do nosso grupo demonstraram um aumento dos níveis de IRF3 fosforilado (Mustafá, tese em andamento). Para melhor compreender o papel de IFN nesses processos, poderíamos utilizar anticorpos neutralizantes específicos IFN- β e IFN- α e/ou para IFNAR. Outros ensaios que estamos padronizando é a depleção de IFNAR por técnica de CRISPR/Cas9; até o momento estabelecemos as estratégias de transfecção com os plasmídeos, buscando maior eficiência com baixa toxicidade.

O modelo de HBMECs depletadas de IFNAR será também importante para determinar o papel dessa citocina e sua sinalização para o controle da replicação de ZIKV ou indução de efeito citopático. O fato de que a concentração de partículas infecciosas liberadas por HBMECs infectadas com ZIKV_{MR766} foi muito superior àquela detectada nos sobrenadantes das células infectadas com ZIKV_{PE243} pode estar relacionado a uma maior resistência da cepa africana a sinalização antiviral disparada por IFN. De fato, cálculos de IC₅₀ demonstraram que uma concentração 20 vezes maior de IFN- β foram necessários para 50% de efeito antiviral sobre ZIKV_{MR766}, em relação a ZIKV_{PE243}.

Em seguida, tentamos estabelecer um modelo para avaliar o papel das respostas ao IFN *in vivo*, utilizando dois modelos animais Camundongos IFNAR^{-/-} são largamente reconhecidos por serem susceptíveis a infecção com ZIKV (Rossi, et al., 2016) e foram previamente utilizados por nosso grupo para avaliação de integridade da BBB e dos mecanismos de proteção imunes, a partir de inoculação sistêmica (Papa *et al.*, 2017; Lucas et al., 2018). Nesses trabalhos foi descrito que cepas das linhagens asiática e africana atingem o SNC dos animais SvA129 onde ambas são capazes de replicar. Porém somente os animais infectados por ZIKV_{MR766} vieram a óbito. Esses animais apresentaram sinais de hemorragia e infiltrado leucocitário em tempos posteriores a detecção do vírus no SNC. Esses estudos sugerem que o ZIKV é capaz de atravessar a BBB sem causar ruptura de sua integridade; no entanto, uma vez no SNC há a lesão mais tardia da BBB, possivelmente devido a indução de uma resposta neuroinflamatória. Além disso, a indução de resposta mediada por linfócitos TCD4⁺ sistêmicos e produção de anticorpos neutralizantes foi estimulada, principalmente, nos animais infectados com ZIKV_{PE243}, protegendo-os da neuroinvasão e lesão de BBB.

Em paralelo, utilizamos também camundongos IFNAR^{+/+} para avaliarmos modulação de resposta ao IFN-I e podermos investigar a infecção e integridade da BBB na presença de resposta a IFN. No entanto, estudos anteriores reportaram que esses animais são resistentes a infecção sistêmica por ZIKV (Lazear, et al., 2016). Essa resistência parece se dever ao fato de que o ZIKV é capaz de degradar STAT2 humana, mas não STAT murino (Grant, et al., 2016).

Além disso, nosso grupo demonstrou que a infecção de camundongos gestantes C57Bl/6, ou seja WT no que diz respeito a expressão de IFNAR, embora não induza manifestações clínicas evidentes na mãe, leva a alterações significativas na prole, indicando que há replicação viral, com impacto fenotípico, mesmo na presença de IFNs do tipo I (Andrade, *et al.*, 2021).

Para sobrepujar a resposta imune sistêmica protetora e investigar o impacto da replicação do vírus no SNC sobre a BBB, os animais foram inoculados via intracerebroventricular (i.c.v.). Estudos anteriores, utilizando essa via de inoculação demonstraram um aumento progressivo de RNA viral em camundongos suíços infectados com ZIKV_{PE243}, além da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL1 β e, TNF- α de forma depende de replicação. Também foi encontrada microgliose proeminente nos córtex parietal e frontal consistente com a presença de RNA viral nessas regiões do cérebro no mesmo período pós infecção, porém não levando os animais a óbito (Figueiredo, *et al.*, 2019).

Tal como reportado por Lucas e colaboradores no modelo de infecção sistêmica, nós observamos que animais IFNAR^{-/-}, infectados i.c.v., apresentaram perda de peso e vieram a óbito apenas pela infecção pelo vírus ZIKV_{MR766}, mas não por ZIKV_{PE243}. No modelo de inoculação intravenosa, parte desses animais vinham a óbito entre o terceiro e sexto dia, porém no modelo de infecção i.c.v. mais de 90% dos animais vieram a óbito já no quarto dia pós infecção. Observamos alta carga de RNA viral nos cérebros, a partir de 2 dias de infecção, sem diferença estatística entre as concentrações observadas de cada vírus. No entanto, notamos produção quase 1000x maior de partículas infecciosas de ZIKV_{MR766} em relação a ZIKV_{PE243}, semelhante ao observado no modelo de inoculação i.v.

Já os animais IFNAR^{+/+} infectados por ZIKV_{PE243} ou ZIKV_{MR766} não apresentaram perda de peso, morte ou qualquer outro sinal clínico durante o período de tempo observado, mostrando que a resposta ao IFN-I, provavelmente disparada no próprio SNC, é necessária na proteção contra as manifestações neurológicas e letalidade induzidas pela infecção. De fato, detectamos a expressão de IFN- β e de ISG15 no cérebro dos animais, infectados com ambas as cepas de ZIKV, confirmando que houve produção e resposta a IFN nesse modelo.

Para tentarmos explicar como a resposta a citocina pode proteger o animal IFNAR^{+/+}, analisamos a carga viral no cérebro desses animais. Observamos que ZIKV_{PE243} não foi capaz de produzir partículas infecciosas até o 4 dia pós infecção, enquanto ZIKV_{MR766} foi capaz de produzir partículas infecciosas em títulos semelhantes ao produzidos em animais IFNAR^{-/-}, mostrando que esse vírus escapa de forma muito eficiente a resposta ao IFN-I. Esses achados são surpreendentes, uma vez que os estudos anteriores indicavam que os mecanismos de escape ao IFN dependiam da degradação de STAT-2 e que esse vírus não degradavam STAT-2 murina. Os trabalhos de Grant *et al.*, 2016 foram feitas com clone sintetizado com base na sequência GenBank KJ776791.1 do isolado da Polinésia Francesa, intimamente relacionado às cepas de ZIKV envolvidas na epidemia em andamento nas Américas (isolados da linhagem Asiática).

No nosso trabalho, o vírus utilizado foi isolado ancestral MR766 e devemos lembrar que após ser isolado, esse vírus foi extensivamente passado em células de cérebro de camundongo (Dick, Kitchen e Haddow, 1952), o que pode tê-lo tornado mais adaptado a replicação no cérebro desses animais. Ainda assim, é importante notar que, embora a replicação de ZIKV_{MR766} tenha sido semelhante nos animais IFNAR^{-/-} e IFNAR^{+/+}, apenas os primeiros apresentaram manifestações neurológicas foram óbito. Esses dados sugerem que a resposta mediada por interferons do tipo I não protegeu os camundongos da replicação viral, mas foi suficiente para protegê-los do dano neurológico e morte. Além disso, outros mecanismos, independentes de IFN foram importantes para o controle da replicação viral, uma vez que houve diferença nos níveis de replicação, no fenótipo e letalidade dos camundongos infectadas com ZIKV_{MR766}, em relação a ZIKV_{PE243} nos animais deficientes de IFNAR. Ainda, a replicação viral nas células infectadas não é suficiente para gerar dano neurológico e morte, uma vez que ZIKV_{MR766} replicação com semelhante eficiência em camundongos IFNAR^{-/-} e IFNAR^{+/+}, no entanto, só os primeiros foram a óbito.

A infecção por ZIKV ganhou atenção do mundo quando sua infecção foi associada a graves distúrbios neurológicos no surto nas Américas em 2015. Apesar de existirem duas linhagens de ZIKV (Africana e Asiática) (Gong *et al.*, 2016), apenas as cepas da linhagem asiática foram associadas a doenças graves em humanos (Lanciotti *et al.*, 2015). Assim, muitos grupos de pesquisa realizaram estudos comparando diferentes isolados virais, com o objetivo de compreender as diferenças observadas na clínica de indivíduos infectados com vírus das linhagens africana e asiática. É importante notar, no entanto, que para esse propósito é necessário que se compare diferentes isolados de ambas as linhagens, o que não foi feito no presente estudo. Além disso, muitos desses trabalhos, incluindo o nosso, se basearam na cepa

ancestral MR766 que, como descrito, pode ter sofrido neuroadaptação para replicação em camundongos durante seu isolamento. Ainda assim, essas comparações podem ser relevantes para desvendar as diferenças moleculares e biológicas entre as cepas com distintas e reconhecidas sequências de genoma. Sendo esse o motivo do seu sucesso replicativo, podemos considerar que foi incorporado alguma mudança no genoma ou estrutura desse vírus que permita que ZIKV_{MR766} seja altamente eficiente em evadir a resposta ao IFN-I. Foi descrito por Lanciotti et al., 2008 que cepas de ZIKV da linhagem asiática possuem quatro aminoácidos a mais na sequência correspondente a proteína do envelope, não estão presentes em ZIKV_{MR766} (linhagem africana) Entretanto, não se sabe se essa diferença estaria relacionada com as diferenças observadas entre as linhagens.

7. CONCLUSÕES

- A cinética de replicação de ZIKV_{PE243} e ZIKV_{MR766}, em HBMECs, é semelhante, no entanto, há maior produção de partículas infecciosas após a infecção por ZIKV_{MR766};
- ZIKV_{PE234} é mais eficiente ao se ligar as HBMECs, porém a cepa ZIKV_{MR766} possui maior capacidade de invadir a célula;
- A infecção de HBMECs com ZIKV_{MR766} induz maior expressão de TLR3 em relação a infecção com ZIKV_{PE243}. Não foi detectada diferença na indução de expressão dos receptores RIG-I em nenhum dos momentos analisados;
- A cepa ZIKV_{MR766} induz uma maior produção de IFN- β e é mais resistente à resposta quando comparada a cepa ZIKV_{PE243};
- ZIKV_{MR766} é capaz de produzir mais partículas infecciosas que ZIKV_{PE243} *in vivo*;
- Ambos os vírus são capazes de replicar em animais IFNAR^{-/-}, mas apenas ZIKV_{MR766} replica em animais IFNAR^{+/+} em tempos mais iniciais a infecção, mostrando que essa cepa também é capaz de escapar da resposta ao IFN-I *in vivo*;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade CBV, Monteiro VRS, Coelho SVA, Gomes HR, Sousa RPC, Nascimento VMO, Bloise FF, Matthews SG, Bloise E, Arruda LB, Ortiga-Carvalho TM. ZIKV Disrupts Placental Ultrastructure and Drug Transporter Expression in Mice. *Front Immunol.* 2021 May 21;12:680246. doi: 10.3389/fimmu.2021.680246. PMID: 34093581; PMCID: PMC8176859.

Ashour, J.; Laurent-Rolle, M.; Shi, P.Y.; Garcia-Sastre, A. NS5 of Dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* 2009, 83, 5408–5418.

Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MU, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet* 2016 Jan. 14 [Epub ahead of print].

Bos S, Viranaicken W, Turpin J, El-Kalamouni C, Roche M, Krejbich-Trotot P, Desprès P, Gadea G. The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology.* 2018 Mar;516:265-273. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.003. Epub 2018 Feb 1. Erratum in: *Virology.* 2019 Jan 2;526:233. PMID: 29395111.

Bowen, J.R.; Quicke, K.M.; Maddur, M.S.; O'Neal, J.T.; McDonald, C.E.; Fedorova, N.B.; Puri, V.; Shabman, R.S.; Pulendran, B.; Suthar, M.S. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human

Broutet N, Krauer F, Riesen M, et al. Zika Virus as a Cause of Neurologic Disorders. *N Engl J Med.* 2016;374(16):1506-1509. doi:10.1056/NEJMp1602708

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015 Oct;21(10):1885-6. doi: 10.3201/eid2110.150847. PMID: 26401719; PMCID: PMC4593454.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun;20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138. PMID: 24856001; PMCID: PMC4036769.

Coelho SVA, Neris RLS, Papa MP, Schnellrath LC, Meuren LM, Tschoeke DA, Leomil L, Verçoza BRF, Miranda M, Thompson FL, Da Poian AT, Souza TML, Carneiro FA, Damaso CR, Assunção-Miranda I, de Arruda LB. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *J Virol Methods.* 2017 Aug;246:65-74. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.04.011. Epub 2017 Apr 23. PMID: 28445704.

Coldbeck-Shackley RC, Eyre NS, Beard MR. The Molecular Interactions of ZIKV and DENV with the Type-I IFN Response. *Vaccines (Basel).* 2020 Sep 14;8(3):530. doi: 10.3390/vaccines8030530. PMID: 32937990; PMCID: PMC7565347.

Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandão WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpigel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrão-Braga PC. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016 Jun 9;534(7606):267-71. doi: 10.1038/nature18296. Epub 2016 May 11. PMID: 27279226; PMCID: PMC4902174.

Dallasta LM, Pisarov LA, Esplen JE, Werley JV, Moses AV, Nelson JA, Achim CL. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol.* 1999 Dec;155(6):1915-27. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65511-3. PMID: 10595922; PMCID: PMC1866950.

Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G, Weisgrau KL, Mohns MS, Breitbart ME, Rasheed MN, Newman CM, Gellerup DD, Moncla LH, Post J, Schultz-Darken N, Schotzko ML, Hayes JM, Eudailey JA, Moody MA, Permar SR, O'Connor SL, Rakasz EG, Simmons HA, Capuano S, Golos TG, Osorio JE, Friedrich TC, O'Connor DH. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun.* 2016 Jun 28;7:12204. doi: 10.1038/ncomms12204. PMID: 27352279; PMCID: PMC4931337.

Estévez-Herrera J, Pérez-Yanes S, Cabrera-Rodríguez R, Márquez-Arce D, Trujillo-González R, Machado JD, Madrid R, Valenzuela-Fernández A. Zika Virus Pathogenesis: A Battle for Immune Evasion. *Vaccines (Basel).* 2021 Mar 22;9(3):294. doi: 10.3390/vaccines9030294. PMID: 33810028; PMCID: PMC8005041.

Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond).* 1979 Oct;83(2):213-9. doi: 10.1017/s0022172400025997. PMID: 489960; PMCID: PMC2129900.

- Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FC, Costa CV, Melo HM, Mota-Sales AP, Saraiva LM, Klein WL, Sebollela A, De Felice FG, Ferreira ST. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight $\alpha\beta$ oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *J Neurosci*. 2013 Jun 5;33(23):9626-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0482-13.2013. PMID: 23739959; PMCID: PMC6619709.
- Figueiredo, C.P., Barros-Aragão, F.G.Q., Neris, R.L.S. *et al.* Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat Commun* **10**, 3890 (2019).
- G. W. A. Dick, S. F. Kitchen, A. J. Haddow, Zika Virus (I). Isolations and serological specificity, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 46, Issue 5, September 1952, Pages 509–520,
- Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016 May 13;352(6287):816-8. doi: 10.1126/science.aaf6116. Epub 2016 Apr 10. PMID: 27064148.
- Gong, Z., Gao, Y., & Han, G.Z. (2016) Zika virus: two or three lineages? *Trends Microbiol.* 24,521 - 522.
- Grab DJ, Garcia-Garcia JC, Nikolskaia OV, Kim YV, Brown A, Pardo CA, Zhang Y, Becker KG, Wilson BA, de A Lima AP, Scharfstein J, Dumler JS. Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jul 21;3(7):e479. doi: 10.1371/journal.pntd.0000479. PMID: 19621073; PMCID: PMC2707606.
- Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, Schwarz MC, Sánchez-Seco MP, Evans MJ, Best SM, García-Sastre A. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe*. 2016 Jun 8;19(6):882- 90. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009. Epub 2016 May 19. PMID: 27212660; PMCID: PMC4900918.
- Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis*. 2017 Dec 16;216(suppl_10):S860-S867. doi: 10.1093/infdis/jix451. PMID: 29267917; PMCID: PMC5853376.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol*. 2015;89:8880–96. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
- Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, Hwang J, Uraki R, Gaitsch HF, Parnell LA, Cao B, Mysorekar IU, Rothlin CV, Fikrig E, Diamond MS, Iwasaki A. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep*. 2017 Apr 18;19(3):558- 568. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.058. PMID: 28423319; PMCID: PMC5485843.
- He Z, Zhu X, Wen W, Yuan J, Hu Y, Chen J, An S, Dong X, Lin C, Yu J, Wu J, Yang Y, Cai J, Li J, Li M. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by Targeting Adaptor Protein MAVS. *J Virol*. 2016 Jul 27;90(16):7219-7230. doi: 10.1128/JVI.00221-16. PMID: 27252539; PMCID: PMC4984625.
- Javed F, Manzoor KN, Ali M, Haq IU, Khan AA, Zaib A, Manzoor S. Zika virus: what we need to know? *J Basic Microbiol*. 2018 Jan;58(1):3-16. doi: 10.1002/jobm.201700398. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29131357.
- Kell AM, Gale M Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 2015 May;479-480:110-21. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.017. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25749629; PMCID: PMC4424084.
- Khaiboullina S, Uppal T, Kletenkov K, St Jeor SC, Garanina E, Rizvanov A, Verma SC. Transcriptome Profiling Reveals Pro-Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinase Activation in Zika Virus Infected Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 12;10:642. doi: 10.3389/fphar.2019.00642. PMID: 31249527; PMCID: PMC6582368.
- Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687-96. doi: 10.1007/s00705-006- 0903-z. Epub 2007 Jan 3. PMID: 17195954.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287. PMID: 18680646; PMCID: PMC2600394.
- Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor Ldel C. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016 May;22(5):933-5. doi: 10.3201/eid2205.160065. PMID: 27088323; PMCID: PMC4861537.
- Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., et al. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 14, 1232–1239.

- Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016 May 11;19(5):720-30. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.010. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27066744; PMCID: PMC4866885.
- Lee HJ, Choi B, Kim Y, Lee SE, Jin HJ, Lee HS, Chang EJ, Kim SW. The Upregulation of Toll-Like Receptor 3 via Autocrine IFN- β Signaling Drives the Senescence of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Through JAK1. *Front Immunol*. 2019 Jul 23;10:1659. doi: 10.3389/fimmu.2019.01659. PMID: 31396213; PMCID: PMC6665952.
- Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava Jose A, Chai G, Sheets N, Tang W, Terskikh Alexey V, Shrestha S, Gleeson Joseph G. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016b; 19:593–598. [PubMed: 27545505]
- Lucas CGO, Kitoko JZ, Ferreira FM, Suzart VG, Papa MP, Coelho SVA, Cavazzoni CB, Paula-Neto HA, Olsen PC, Iwasaki A, Pereira RM, Pimentel-Coelho PM, Vale AM, de Arruda LB, Bozza MT. Critical role of CD4⁺ T cells and IFN γ signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nat Commun*. 2018 Aug 7;9(1):3136. doi: 10.1038/s41467-018-05519-4. PMID: 30087337; PMCID: PMC6081430.
- McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015 Feb;15(2):87-103. doi: 10.1038/nri3787. PMID: 25614319; PMCID: PMC7162685.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb;9(1):4-9. doi: 10.1016/s0952-7915(97)80152-5. PMID: 9039775.
- Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau VM, Couplier M, Missé D, Jouvenet N, Tabibiazar R, Gressens P, Schwartz O, Amara A. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*. 2017 Jan 10;18(2):324-333. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.045. PMID: 28076778.
- Mladinich MC, Schwedes J, Mackow ER. Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *mBio*. 2017 Jul 11;8(4):e00952-17. doi: 10.1128/mBio.00952-17. PMID: 28698279; PMCID: PMC5513708.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popovic, M., Poljsak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., et al. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 374, 951–958.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22. doi: 10.1038/nrmicro1067. PMID: 15608696.
- Muñoz-Jordán JL, Fredericksen BL. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses*. 2010 Feb;2(2):676-91. doi: 10.3390/v2020676. Epub 2010 Feb 23. PMID: 21994652; PMCID: PMC3185611.
- Munoz-Jordan, J.L.; Laurent-Rolle, M.; Ashour, J.; Martinez-Sobrido, L.; Ashok, M.; Lipkin, W.I.; Garcia-Sastre, A. inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of Flaviviruses. *J. Virol*. 2005, 79, 8004–8013.
- Munoz-Jordan, J.L.; Sanchez-Burgos, G.G.; Laurent-Rolle, M.; Garcia-Sastre, A. Inhibition of interferon signaling by Dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 14333–14338.
- Mustafá Y.M. Papel do interferon do tipo I em células do endotélio microvascular cerebral humano infectadas com vírus Zika. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, p. 90. 2018
- Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, de Arruda LB. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Front Microbiol*. 2019;10:525. Published 2019 Mar 28. doi:10.3389/fmicb.2019.00525
- Nazmi A, Dutta K, Hazra B, Basu A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus Res*. 2014 Jun 24;185:32-40. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.013. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24657789.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., et al. (2013). Zika virus infection complicated by Guillain- Barre syndrome — case report, French Polynesia. *Euro Surveill* 19.
- Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Front Microbiol*. 2017;8:2557. Published 2017 Dec 22.

- Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandão WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpiguel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrão-Braga PC. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016 Jun 9;534(7606):267-71. doi: 10.1038/nature18296. Epub 2016 May 11. PMID: 27279226; PMCID: PMC4902174.
- Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O'Neal JT, Rajakumar A, Wrammert J, Rimawi BH, Pulendran B, Schinazi RF, Chakraborty R, Suthar MS. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2016 Jul 13;20(1):83-90. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.015. Epub 2016 May 27. PMID: 27247001; PMCID: PMC5166429.
- Retallack H, Di Lullo E, Arias C, Knopp KA, Laurie MT, Sandoval-Espinosa C, Mancia Leon WR, Krencik R, Ullian EM, Spatazza J, Pollen AA, Mandel-Brehm C, Nowakowski TJ, Kriegstein AR, DeRisi JL. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Dec 13;113(50):14408-14413. doi: 10.1073/pnas.1618029113. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27911847; PMCID: PMC5167169.
- Riedl W, Acharya D, Lee JH, Liu G, Serman T, Chiang C, Chan YK, Diamond MS, Gack MU. Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG- I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host Microbe*. 2019 Oct 9;26(4):493- 503.e6. doi: 10.1016/j.chom.2019.09.012. PMID: 31600501; PMCID: PMC6922055.
- Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, Langsjoen RM, Paessler S, Vasilakis N, Weaver SC. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Jun 1;94(6):1362-1369. doi: 10.4269/ajtmh.16-0111. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27022155; PMCID: PMC4889758.
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24555472; PMCID: PMC4313732.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY, Cernach M, El-Husny AS, Pone MV, Serao CL, Sanseverino MT; Brazilian Medical Genetics Society–Zika Embryopathy Task Force. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jan 29;65(3):59-62. doi: 10.15585/mmwr.mm6503e2. PMID: 26820244.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY, Cernach M, El-Husny AS, Pone MV, Serao CL, Sanseverino MT; Brazilian Medical Genetics Society–Zika Embryopathy Task Force. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jan 29;65(3):59-62. doi: 10.15585/mmwr.mm6503e2. PMID: 26820244.
- Simpson, D.I. (1964). Zika Virus Infection in Man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 58, 335–38.
- Song BH, Yun SI, Woolley M, Lee YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol*. 2017 Jul 15;308:50-64. doi:
- Stins MF, Badger J, Sik Kim K. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*. 2001 Jan;30(1):19-28. doi: 10.1006/mpat.2000.0406. PMID: 11162182.
- Suthar, M.S., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2013). Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathog* 9, e1003541.
- Tabata T, Pettit M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, Harris E, Pereira L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe*. 2016 Aug 10;20(2):155-66. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.002. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27443522; PMCID: PMC5257282.
- Takaoka, A.; Yanai, H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell. Microbiol*. 2006, 8, 907-922.
- Tissari J, Sirén J, Meri S, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J Immunol*. 2005 Apr 1;174(7):4289-94. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4289. PMID: 15778392.

Tripathi, S.; Balasubramaniam, V.R.; Brown, J.A.; Mena, I.; Grant, A.; Bardina, S.V.; Maringer, K.; Schwarz, M.C.; Maestre, A.M.; Sourisseau, M.; et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog.* 2017, 13, e1006258.

Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, Ihry RJ, Kommineni S, Bilican B, Klim JR, Hill EJ, Kane LT, Ye C, Kaykas A, Eggan K. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell.* 2016 Dec 1;19(6):703-708. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.011. PMID: 27912091.

WHO: Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus: [https://www.who.int/news/item/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-\(2005\)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus](https://www.who.int/news/item/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-(2005)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus) – Acesso em Setembro de 2021

Ye J, Chen Z, Li Y, Zhao Z, He W, Zohaib A, Song Y, Deng C, Zhang B, Chen H, Cao S. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. *J Virol.* 2017 Mar 29;91(8):e00039-17. doi: 10.1128/JVI.00039-17. PMID: 28179530; PMCID: PMC5375679.

Yun SI, Lee YM. Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(2):263-79. doi: 10.4161/hv.26902. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24161909; PMCID: PMC4185882.