

Sharton Vinícius Antunes Coelho

Padronização da infecção pelo vírus Zika em modelos *in vitro*
e *in vivo*.



Monografia apresentada 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
2017

Trabalho 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 Flávio Lemos Matassoli.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sharton Vinícius Antunes Coelho

Padronização da infecção pelo vírus Zika em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Rio de Janeiro, 06 de novembro de 2017.

(Renata Meirelles Pereira, Professor Adjunto do IMPPG, UFRJ)

(Juliana Echevarria Lima, Professor Adjunto do IMPPG, UFRJ)

(Carolina Gonçalves de Oliveira Lucas, Doutora, IMPPG, UFRJ)

(Maite Vaslin de Freitas Silva, Professor Associado, IMPPG, UFRJ)

**A todos os irmãos da verdade e
do conhecimento.**

AGRADECIMENTOS

- A Deus e a todos os mentores que me proporcionam a possibilidade de descobrir conhecimentos na condição em que me encontro. A fé, independente de qual seja, também é força para superar, aceitar e suportar inúmeras situações que poderiam ser motivos de desistência;
- Ao meu anjo da guarda e ao meu Pai Tomás, pois o intelecto e a moral devem caminhar sempre juntos;
- Aos meus pais e irmãos, família carinhosa e batalhadora. Foram pelas lágrimas na seca que construímos e construiremos nossos mares para que muitos outros também possam suportar e superar;
- A minha orientadora, pela paciência e vontade. Não construímos nada nesse mundo sozinhos. Todo conhecimento é passado de degrau para degrau, assim, um dia, alto e baixo será apenas questão de interpretação;
- Ao meu coorientador Flávio Matassoli pelo auxílio e paciência;
- Aos meus colegas de laboratório, por proporcionarem alegrias e discussões, mantendo o pensamento vivo e contínuo;
- A todos que compartilharam de alguma forma essa etapa da minha vida. Que permaneçam, pois a jornada ainda é longa;
- Ao nosso técnico Ronaldo, sempre dedicado a nos auxiliar;
- Às agências de fomento, CNPq, FAPERJ, CAPES, FINEP.
- A todos:

A busca pelo conhecimento é um processo infinito de constante esforço. O amor é um nutriente imprescindível para união de todos os diferentes passos que se encontrarão no final da estrada, para início de outra melhor e mais feliz. Mas para isso, devemos entender:

São frestas claras, frestas escuras
De choros longos e largos, de rasos choros.
São sorrisos de diversas bocas,
De diversas faces, cores e raças,
De sepulcros sólidos e inconsistentes.
São palavras sem sentido em pensamentos conscientes;
É o homogêneo que engana ou que transforma,
Na escada sem degraus que eleva.
São as futilidades da vida, os gostos da vida, a vida gostosa,
Ou os desgostos da vida, tumulto do corpo e o sossego da alma.
E tudo é para o sossego da alma,
O tumulto do corpo ou os desgostos da vida,
As futilidades ou a vida gostosa,
É o homogêneo enganando para a aprendizagem,
De como subir uma escada sem degraus.
São pensamentos conscientes em palavras sem sentido,
Seja do sólido ou inconsistente sepulcro,
Seja de raças, cores, faces ou bocas de sorrisos,
Tudo se dá por choros longos e largos, por rasos choros,
De frestas claras ou frestas escuras.

S.V.

Já é tempo de libertação. Rompem-se as correntes da ignorância que aprisionam as mentes obscuras. Os adeptos a prisão das almas não suportarão o sopro dos ventos que arrastam os vestígios da superioridade relativa. As ondas da renovação limpam toda a sujeira que estagna o progresso. O processo é simples. Não há mais tempo para as correntes que prendem os diferentes passos tendendo a um mesmo fim. A carne apodrece sem desigualdade, os vermes saciam a fome e arrancam todo o peso da vida sofrida. De resto transcende apenas o todo do pensamento que se reparará com o tempo não cronológico do ser.

Como tudo um dia teve “fim”, não será diferente desta vez. É necessário um cessar para que haja um novo começo, continuo ao que foi iniciado, pois, no vazio infinito das mentes obscuras existe uma sentelha de luz, a qual nasce no existir e concretiza-se pela evolução.

S.V.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos de ZIKV suspeitos e notificados no Brasil.....	3
Figura 2: Distribuição da transmissão de ZIKV.....	4
Figura 3: Estrutura e genoma do ZIKV.....	5
Figura 4: Replicação de flavivírus.....	7
Figura 5: Rotas de transmissão do ZIKV.....	9
Figura 6: Casos notificados de ZIKV relacionados com alterações congênitas.....	11
Figura 7: Padronização da titulação de ZIKV em células Vero.....	27
Figura 8: Cinética da replicação de ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-AFR em células Vero.....	29
Figura 9: Cinética da replicação de ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-AFR em células C6/36.....	31
Figura 10: Comportamento de ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-BR^{SP} em C6/36 e Vero.....	33
Figura 11: Susceptibilidade da infecção por ZIKV em diferentes linhagens de camundongos.....	36
Figura 12: Infecção de ZIKV em linhagens de camundongos gestantes.....	39
Figura 13: Comparação das linhagens gestantes frente ao tempo de infecção.....	40
Figura 14: Comparação das linhagens de camundongos infectados por ZIKV frente à gestação.....	41
Figura 15: Análise do perfil de citocinas da linhagem C57BL/6 frente a infecção durante a gestação.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Suscetibilidade e permissividade de diferentes linhagens celulares à replicação ZIKV.....	35
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ZIKV.....	Zika vírus
MR766.....	Macaco Rhesus 766
DENV.....	Vírus da dengue
CHIKV.....	Vírus Chikungunya
WNV.....	Vírus Oeste do Nilo
RT-PCR.....	Reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
SE.....	Semana epidemiológica
NS.....	Proteínas não estruturais
Nt.....	Nucleotídeos
C.....	Proteína de capsídeo
E.....	Proteína de envelope
PrM.....	Proteína precursora de membrana
ORF.....	”Quadro aberto de leitura”
NCR.....	Regiões não codificantes
YFV.....	Vírus da febre amarela
RE.....	Retículo endoplasmático
SGB.....	Síndrome de Guillain-Barré
DC.....	Célula dendrítica
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
SNC.....	Sistema nervoso central
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
Ecs.....	Células endoteliais
Ifnar 1 ^{-/-}	Nocaute para receptor de interferon do tipo 1
Ifnar 1 e 2 ^{-/-}	Nocaute para receptor de interferon do tipo 1 e 2
(E).....	Período embrionário de gestação
MOI.....	Multiplicidade de infecção
SFB.....	Soro fetal bovino
CPE.....	Efeito citopático
PFU.....	Unidades formadoras de plaque
MOCK.....	Sobrenadante de células não infectadas

CMC.....Carboximetilcelulose
d.p.i.....Dias pós-infecção
CT.....”Limiar do ciclo”
i.v.....Intravenoso
IFN.....Interferon

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Histórico e epidemiologia.....	1
1.2.Estrutura e genoma do vírus da Zika	4
1.3.Replicação viral	6
1.4.Patogênese do vírus da Zika	7
1.4.1.Zika vírus e microcefalia - Síndrome Congenita do Zika	10
1.4.2.Células primárias e linhagens celulares susceptíveis a infecção por ZIKV <i>in vitro</i>	12
1.5.Zika vírus e resposta imune.....	14
1.5.1. Infecção e análise da resposta imune em modelos <i>in vivo</i>	15
1.5.2.Modelos experimentais de infecção por ZIKV em gestantes	17
2.JUSTIFICATIVA	19
3.OBJETIVOS	20
3.1.Objetivo Geral	20
3.2.Objetivos Específicos	20
4.MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1.Cultura de células	21
4.2.Vírus	22
4.3.Propagação em cultura de células.....	22
4.4.Titulação por ensaio de placa	22
4.5.Análise da replicação viral por qRT-PCR	23
4.6.Camundongos	23
4.7.Infecção e processamento por qRT-PCR dos tecidos animais	24
4.8. Análise do perfil de citocinas por qRT-PCR dos tecidos murinos.....	24
4.9.Avaliação da viremia	25
5.0.Análise estatística	25
5.RESULTADOS	26
5.1.Titulação de ZIKV-AFR ₇₆₆ e ZIKV-BR _{PE} em células Vero.....	26
5.2.Padronização da cinética de replicação de ZIKV-AFR e ZIKV-BR ^{PE} em células C6/36 e Vero	27
5.3.Suscetibilidade e permissividade de diferentes linhagens celulares à replicação ZIKV	34
5.4.Suscetibilidade da infecção por ZIKV em linhagens de camundongos imunocompetentes e imunodeficientes.....	35
5.5.Suscetibilidade da infecção por ZIKV em diferentes linhagens de camundongos gestantes	36

5.6. Análise do perfil de citocinas da linhagem C57BL/6 frente à infecção durante a gestação.....	42
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO 1.....	61
ANEXO 2.....	62
ANEXO 3.....	63

RESUMO

SHARTON VINÍCIUS ANTUNES COELHO

PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Orientadora: Luciana Barros de Arruda
Co-orientador: Flávio Lemos Matassoli

Resumo da Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A emergência da infecção pelo vírus Zika (ZIKV) tem estimulado vários grupos de pesquisa a estudar e colaborar na compreensão da biologia e patogênese do vírus, determinante para o desenvolvimento de medicamentos e vacinas antivirais e de avanços e políticas de saúde pública. No entanto, como muitos desses pesquisadores tem vindo de áreas distintas e inexperientes na pesquisa com flavivírus, obstáculos importantes precisariam ser superados para acelerar as investigações, obtendo, por exemplo, protocolos homogêneos para manutenção de estoques virais e estabelecimento de modelos animais para compreensão dos efeitos da infecção durante a gestação. Aqui, objetivou-se desenvolver protocolos padronizados para propagação, titulação e purificação de cepas de linhagens africana e asiática de ZIKV *in vitro*, testando sistematicamente diferentes tipos celulares, cinética, multiplicidade de infecção e protocolos de centrifugação. Iniciamos, ainda, a padronização de um modelo de infecção experimental murina de gestantes e não gestantes com ZIKV, utilizando camundongos imunodeficientes e imunocompetentes, nos quais foi avaliado o perfil de citocinas sistêmicas e na placenta. O vírus mostrou uma infecção produtiva em linhagens de células humanas, de roedores, e de primatas não humanos, com eficiência distinta. Foram obtidos elevados títulos de ZIKV-AFR após 72 h de replicação em células Vero, enquanto que ZIKV-BR foi melhor propagado durante 7 dias em células C6/36. Ambos os casos proporcionaram títulos superiores a 10^7 PFU/ml. O alto rendimento da purificação do vírus foi obtido pelo gradiente descontínuo de sacarose, permitindo estudos futuros da estrutura do vírus e do desenvolvimento de vacinas. *In vivo*, nós observamos que camundongos imunodeficientes A129 são mais susceptíveis à infecção por ZIKV, quando comparado às linhagens imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL, embora a comparação entre as duas últimas linhagens demonstrem diferenças intrínsecas no perfil imunológico que as tornam responsivamente diferentes. Observamos também que gestantes das mesmas linhagens tenderam a ser mais susceptíveis à infecção em comparação com os respectivos grupos não gestantes. Detectamos maior carga viral em fêmeas 15.5 quando comparada com grupos 18.5 para todas às linhagens testadas. Essa tendência no sucesso da infecção em gestantes, assim como a dificuldade desse grupo em combater a infecção foi relacionada com a modificação no

perfil de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 em tecidos do feto, placenta e baço das mães, sugerindo que essa modificação no perfil inflamatório pode estar relacionada com os eventos observados. A normalização destes protocolos permitirá que diferentes laboratórios em todo o mundo possam comparar melhor e discutir dados sobre todas as características da biologia do ZIKV e da doença, contribuindo para uma colaboração mais eficiente e progressão na investigação do vírus.

Palavras- chave: ZIKV, propagação viral, purificação viral, camundongos gestantes, perfil inflamatório, resposta imune sistêmica.

ABSTRACT

SHARTON VINÍCIUS ANTUNES COELHO

PADRONIZAÇÃO DA INFECCÃO PELO VÍRUS ZIKA EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

**Orientadora: Luciana Barros de Arruda
Co-orientador: Flávio Lemos Matassoli**

Monograph abstract presented at the Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, as part of the requirements for obtaining a bachelor's degree in Biological Sciences: Microbiology and Immunology and approval in the discipline RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The emergence of Zika virus (ZIKV) has stimulated several research groups to study and collaborate in the understanding of the biology and pathogenesis of the virus, a determinant for the development of antiviral drugs and vaccines and public health advances and policies. However, as many of these researchers have come from distinct and inexperienced areas in flavivirus research, significant hurdles need to be overcome to accelerate investigations, eg obtaining homogeneous protocols for maintaining viral stocks and establishing animal models for understanding the effects infection during pregnancy. The objective of this study was to develop standardized protocols for propagation, titration and purification of strains of African and Asian strains of ZIKV *in vitro*, systematically testing different cell types, kinetics, infection multiplicity and centrifugation protocols. We also started the standardization of a murine experimental infection model of pregnant and non-pregnant women with ZIKV using immunodeficient and immunocompetent mice, in which the profile of systemic and placental cytokines was evaluated. The virus showed a productive infection in human, rodent, and non-human primate lineages with different efficacy. High titers of ZIKV-AFR were obtained after 72 h of replication in Vero cells, whereas ZIKV-BR was best propagated for 7 days in C6/36 cells. Both cases provided titers in excess of 10^7 PFU/ml. The high yield of virus purification was obtained by the discontinuous sucrose gradient, allowing for future studies of virus structure and vaccine development. *In vivo*, we observed that A129 immunodeficient mice are more susceptible to ZIKV infection when compared to the immunocompetent C57BL/6 and B6SJL lines, although the comparison between the two last lineages demonstrate intrinsic differences in the immunological profile that make them responsively different. We also observed that pregnant women from the same strains tended to be more susceptible to infection compared to their non-pregnant groups. We detected a higher viral load in females 15.5 compared to groups 18.5 for all strains tested. This influence on the success of the infection in pregnant women, as well as the difficulty of this group in combating infection was related to the modification in the profile of cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-6 in fetal, placenta and spleen of the mothers, suggesting that this modification in the

inflammatory profile may be related to the observed events. The standardization of these protocols will enable different laboratories around the world to better compare and discuss data on all characteristics of ZIKV biology and disease, contributing to more efficient collaboration and progression in virus research.

Keywords: ZIKV, viral propagation, viral purification, pregnant mice, inflammatory profile, systemic immune response.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e epidemiologia

O Zika vírus (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947 durante um estudo utilizando macacos Rhesus como ferramenta para a observação de circulação de febre amarela. O nome foi concedido em homenagem ao local onde foi isolada, floresta Zika, Uganda. A partir da observação de sinais clínicos, um dos macacos teve seu soro coletado três dias após a detecção de febre, o qual foi inoculado em cérebros de camundongos. Essa estratégia permitiu o primeiro isolamento do vírus, cujo trabalho foi notificado em 1952. A cepa denominada Zika MR766 foi, posteriormente, isolada de mosquitos *Aedes africanus* e outros macacos Rhesus, certificando, portanto, uma nova arbovirose (DICK, KITCHEN & HADDOW, 1952). Anos depois outros estudos permitiram diversos isolamentos do vírus em mosquitos *Aedes africanus* na Uganda (HADDOW *et al.*, 1964) e pela primeira vez em *Aedes aegypti* na Malásia, mosquito cuja circulação dá-se normalmente em zonas urbanas. Esses dados permitiram afirmar que esses artrópodes são, possivelmente, vetores do ZIKV, podendo transmitir o vírus para outros hospedeiros, e circular não só em zonas rurais como também em zonas urbanas (MARCHETTE, GARCIA & RUDNICK, 1969).

Até 1956 apenas dois relatos de infecção de ZIKV em seres humanos haviam sido notificados na literatura. O primeiro relatou três indivíduos infectados na Nigéria (MACNAMARA, 1954) e uma infecção experimental em um indivíduo voluntário e saudável. Em ambos os casos foram observados os mesmos sinais e sintomas como febre e dores de cabeça (BEARCROFT, 1956). O curso clínico da doença causada pelo ZIKV foi posteriormente avaliado através de testes sorológicos em humanos infectados em diversas localidades da África e da Ásia (SIMPSON, 1964). Mais tarde, através de um estudo retrospectivo na Indonésia, utilizando soros de doadores na fase de febre aguda com evidências de infecção por alfa e flavivírus, o ZIKV foi identificado como o responsável pela infecção em sete dos indivíduos oriundos da região da Java Central (OLSON *et al.*, 1981).

A literatura do estudo de ZIKV permaneceu escassa e poucos casos humanos foram apresentados até 2007. Além disso, os poucos casos encontrados permaneceram associados, muitas vezes, a sintomas clínicos leves e, geralmente, autolimitados como mal-estar e erupção maculopapular (OLSON *et al.*, 1981; SIMPSON, 1964; BEARCROFT, 1956). No entanto, em 2007 houve a notificação alarmante de uma epidemia de ZIKV em seres humanos nas ilhas de Yap na Micronésia (DUFF *et al.*, 2009). No final do ano de 2013, três componentes de uma mesma família Polinésia Francesa apresentaram sintomas característicos de infecção

comum a algumas arboviroses. Nesses últimos casos, testes obtiveram resultados negativos para o vírus da dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), vírus do Oeste do Nilo (WNV) e RT-PCR inconclusivo para ZIKV. Alguns meses depois, um número elevado de indivíduos (cerca de 19.000 casos) manifestaram sintomas correspondentes ao observado em pacientes com ZIKV. A obtenção de 584 exemplares distintos de soros provenientes de pacientes foi analisada e mais de 50% foram positivos para ZIKV (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014).

Após os surtos de 2007 e 2013 na Micronésia e nas ilhas do Pacífico, o ZIKV atingiu o hemisfério ocidental do mundo sendo descrito os primeiros casos na Ilha da Páscoa (MUSSO & GUBLER, 2016b). Posteriormente, foram relatados diversos casos espalhados pelas Américas, causando um grande surto, do Brasil para o mundo (LANCIOTTI *et al.*, 2008; FARIA *et al.*, 2016).

Existem algumas hipóteses de como o vírus chegou ao Brasil, porém nenhuma delas confirmadas até o momento. Uma delas refere-se à possibilidade de entrada do ZIKV no país através do evento da Copa do Mundo realizada em 2014. Entretanto confirmou-se que nenhum país que participou dos jogos havia apresentado casos da infecção anteriormente ao evento (ZANLUCA *et al.*, 2015). Outros dados sugerem a entrada do vírus no país em 2013 com a disputa da Copa das Confederações, no entanto os casos de infecção pelo vírus não foram notificados na Polinésia Francesa (FARIA, *et al.*, 2016). Mesmo diante dessas hipóteses, análises de sequências completas ou parciais de ZIKV coletadas no Brasil mostraram que o vírus já circulava no nordeste do país desde 2014 (FARIA *et al.*, 2017).

Em abril de 2015 pesquisadores da Universidade Federal da Bahia (UFBA) confirmaram os primeiros casos de infecção por ZIKV no Brasil através da utilização da técnica de RT-PCR. Posteriormente, em maio do mesmo ano o vírus foi detectado e notificado pela Fundação Oswaldo Cruz do Paraná (Fiocruz/PR) e pelo Instituto Adolfo Lutz no estado de São Paulo (SP). Esses mesmos casos foram confirmados pelo Instituto Evandro Chagas/SVS/MS. Hoje o ZIKV possui circulação registrada em todas as 27 Unidades Federadas do Brasil, o que caracteriza ampla disseminação do vírus pelo país em um período curto de tempo (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-zika>).

De acordo com o Ministério da Saúde, 215 mil possíveis casos de infecções por ZIKV foram notificados até a semana epidemiológica (SE) 52 no ano de 2016, sendo confirmados oito óbitos pela infecção. Na SE 35 de 2017 15.586 casos prováveis já foram notificados, 6.679 deles já confirmados (**Figura 1**) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

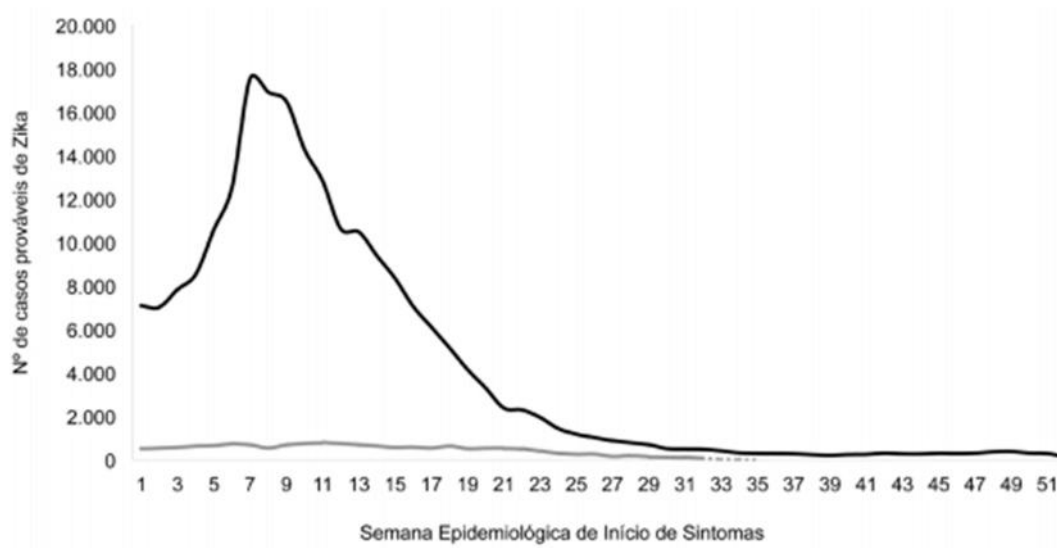


Figura 1. Casos de ZIKV suspeitos e notificados no Brasil. Casos de ZIKV notificados (suspeitos), por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016 até SE 35 de 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br>

De fato, a nítida expansão geográfica do vírus desde os grandes surtos ocorridos (**Figura 2**) é demonstrada pela grande quantidade de países acometidos pela infecção nos três grandes continentes, Americano, Asiático e Africano. Isso tem exigido esforços coletivos das secretarias de vigilância sanitária e centros de pesquisa no combate e controle da propagação do vírus, assim como dos vetores virais. A implementação de testes moleculares como o RT-PCR nesses programas de vigilância foram bem sucedidos no intuito de minimizar os equívocos encontrados no diagnóstico sorológico do ZIKV. No entanto, o diagnóstico sorológico através da busca de anticorpos específicos ainda não é conclusivo e são observadas reações cruzadas com outras arboviroses, o que pode interferir na vigilância epidemiológica e no tratamento da infecção (LANCIOTTI *et al.*, 2008; MUSSO & GUBLER, 2016b).

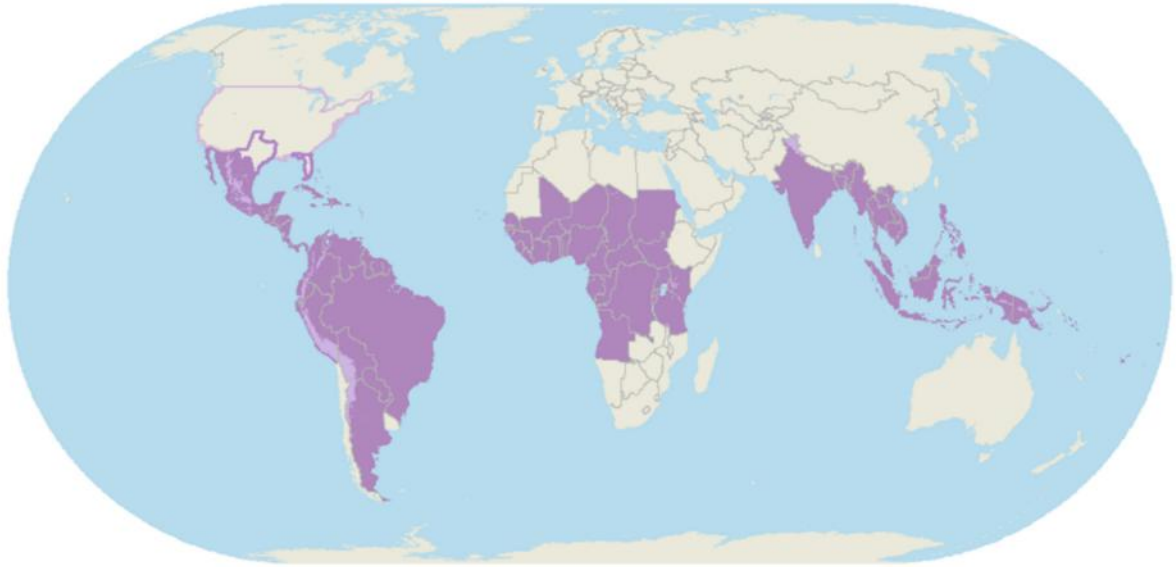


Figura 2. Distribuição da transmissão de ZIKV. Países e territórios associados a transmissões por ZIKV, 2017. Disponível em: www.cdc.gov.

1.2. Estrutura e genoma do vírus da Zika

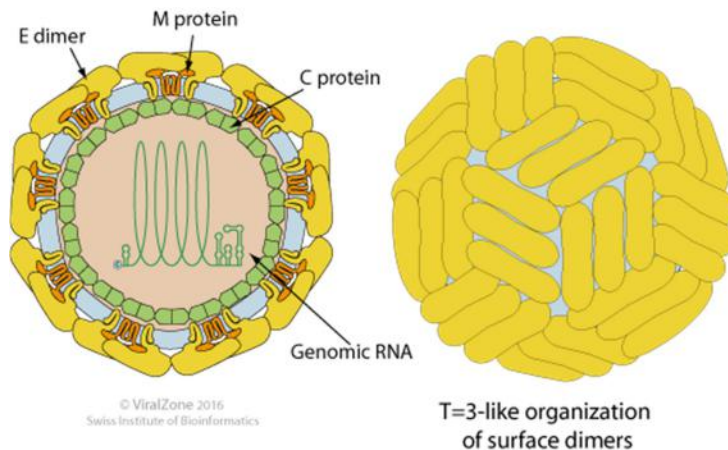
O ZIKV é um vírus da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*, transmitido por vetores artrópodes (arbovírus). Geralmente os vetores são mosquitos do gênero *Aedes*, tais como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A partícula viral possui simetria icosaédrica com cerca de 50 nm composta por um envelope lipídico no qual estão inseridas as proteínas do envelope (E) e membrana (M) (SIROHI *et al.*, 2016). Essas proteínas se originam da membrana plasmática da célula hospedeira, pela qual o vírus é liberado por exocitose. O envelope envolve o capsídeo viral, formado pela proteína C, que encobre o genoma RNA fita simples de polaridade positiva composto por 10.807 nucleotídeos (nt) (**Figura 3A**) (VASILAKIS & WEAVER, 2016). Esse RNA genômico inclui as sequências das proteínas estruturais, capsídeo (C), precursora de membrana (prM) e envelope (E), e não estruturais (NS) essenciais para a replicação e montagem da partícula viral. Todas as sequências estão contidas em uma única estrutura de leitura aberta (ORF) flanqueadas por regiões não codificadoras (NCR) nas extremidades 5' e 3' do RNA genômico (**Figura 3B**) (MUKHOPADHYAY, KUHN & ROSSMANN, 2005).

O ZIKV é separado em três linhagens de acordo com análises das regiões genômicas da RNA polimerase viral (NS5) e da proteína E, sendo uma Asiática e duas linhagens Africanas (BERTHET, *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2016). Os diferentes genótipos de ZIKV apresentam pequenas diferenças nucleotídicas, tal como a inserção de um sítio de glicosilação na proteína

E nos vírus pertencentes à linhagem asiática (HADDOW *et al.*, 2012; SIROHI *et al.*, 2016). Esse evento pode estar relacionado às diferenças na patogênese entre as diferentes linhagens (FEYE *et al.*, 2014; GOO *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2017).

A linhagem africana foi a primeira identificada e cepas da linhagem asiática vem circulando, atualmente, e causando o surto epidêmico nas Américas (WEAVER *et al.*, 2016; CALVET *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2016).

A)



B)

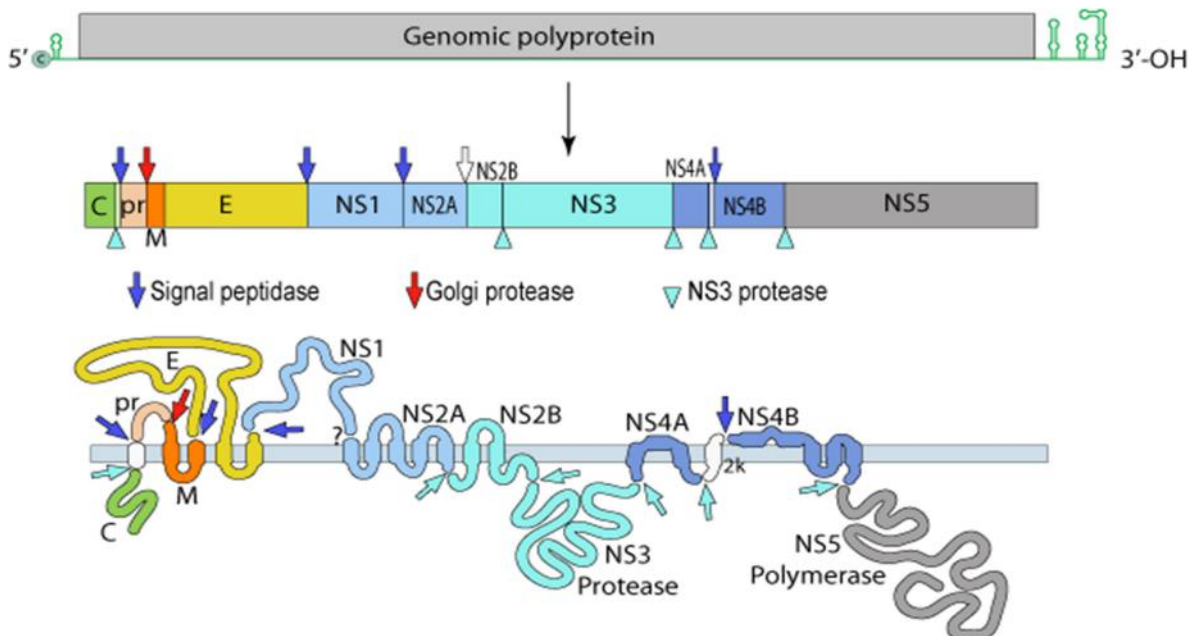


Figura 3: Estrutura e genoma do ZIKV. (A) Representação da estrutura da partícula viral em simetria icosaédrica com as três proteínas estruturais (C, M e E) e seu genoma RNA no interior da estrutura; (B) Representação do genoma viral sintetizado na forma de uma poliproteína composta pelas proteínas estruturais (C, PrM e E) e as sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) mostrando os

sinais de peptidase e a ação de proteases celulares (do Golgi) e viral (NS2b, NS3), que farão clivagem proteolítica nos sítios específicos da poliproteína, liberando cada proteína. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html

1.3. Replicação viral

Ainda é bastante escassa a literatura sobre a replicação do ZIKV. Entretanto, por ser um *Flavivirus*, acredita-se que sua replicação seja semelhante à de outros vírus do mesmo gênero já bem caracterizados, tais como o vírus da Dengue (DENV) e o vírus da febre amarela (YFV) (**Figura 4**) (LINDENBACH *et al.*, 2013).

De acordo com o descrito para outros Flavivirus, inicialmente, o vírus interage e se liga em receptores específicos da superfície da célula hospedeira com o auxílio da glicoproteína E viral; esse processo é denominado adsorção. Posteriormente, a partícula é endocitada e internalizada de maneira dependente de clatrina permanecendo no citoplasma da célula (CHEN *et al.*, 1997; PIERSON & KIELIAN, 2013). Alguns receptores já foram propostos como importantes no processo de adsorção e internalização do ZIKV (NOWAKOWSKI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; MEERTENS *et al.*, 2017; RICHARD *et al.*, 2017), mas esse processo ainda não foi totalmente caracterizado. Alterações no pH decorrentes da acidificação do endossoma acarretam modificações estruturais na glicoproteína E, que permitem a fusão das membranas viral e vesicular. Isso faz com que haja a liberação do nucleocapsídeo e desnudamento do material genético no citoplasma da célula (HARRISON, 2008).

Assim como outros vírus, a replicação do ZIKV ocorre através da formação de um complexo de replicação que inclui a indução da síntese de membrana intracelular, onde permanecem abrigados o material genético, proteínas virais e fatores celulares essenciais para a síntese de novos genomas do vírus (MACKENZIE, JONES & WESTAWAY, 1999; MACKENZIE, 2005).

Uma vez que o genoma viral possui polaridade positiva, após o desnudamento no citoplasma da célula há imediata tradução do material em uma poliproteína. Esta sofre clivagem proteolítica com a participação de proteases do Golgi e da NS3 viral dando origem as proteínas estruturais e não estruturais. Junto à formação e clivagem da poliproteína ocorre a formação de uma fita de RNA complementar de polaridade negativa que permanece como molde para a síntese do genoma de novas partículas. Essas proteínas são direcionadas para os seus respectivos compartimentos iniciando a montagem dos novos vírions. Próximo ao retículo endoplasmático (RE) o vírus adquire a bicamada lipídica com prM e E (LORENZ *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003, ZHANG *et al.*, 2007).

Para que haja a completa formação da nova partícula viral, o vírus deve se tornar infeccioso após a clivagem da prM e modificações pós-traducionais. Esse processo é denominado maturação da partícula viral, e acontece no momento em que são direcionadas pela via secretora do hospedeiro por vesículas. Por fim, as novas partículas são excitadas para o ambiente extracelular (STADLER *et al.*, 1997; MACKENZIE & WESTAWAY, 2001).

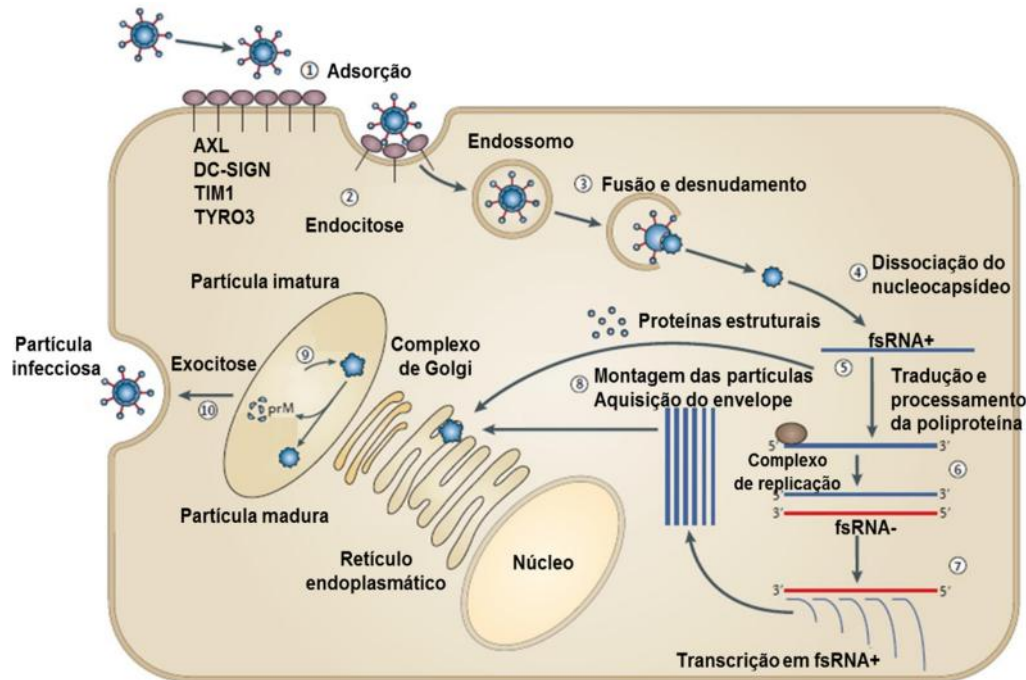


Figura 4: Replicação de flavivírus. Para que haja o ciclo de vida do vírus é preciso que ele siga todos os passos, sendo eles: adsorção seguida de endocitose, fusão de membrana seguida de desnudamento, tradução e replicação do genoma, montagem e maturação da partícula viral e exocitose pela célula do hospedeiro (Adaptado de Suthar *et al.*, 2013)

1.4. Patogênese do vírus da Zika

Normalmente, o ZIKV possui um período de incubação de 4 a 5 dias em humanos e pode desencadear uma infecção assintomática na maioria dos casos ou sintomática moderada apresentando febre, artralgia, rash cutâneo maculopapular e em alguns casos conjuntivite (SUWANMANEE & LUPLERTLOP, 2017; MARTINA, KORAKA & OSTERHAUS, 2009; ABUSHOUK, NEGIDA & AHMED, 2016).

A principal forma de transmissão do ZIKV dá-se pela picada da fêmea do mosquito infectada. O homem como amplificador da carga viral completa um ciclo junto com o vetor artrópode, e ambos em conjunto correspondem a um importante fator para o estabelecimento de epidemias através da perpetuação e da manutenção do vírus em ambiente favorável

(CASALS, 1961; SUWANMANEE & LUPLERTLOP, 2017). Muito embora o vírus tenha sido isolado inicialmente da espécie de mosquitos *Aedes africanus*, sabe-se que o mesmo se propaga por outras espécies do gênero *Aedes* (HADDOW *et al.*, 1964; ABUSHOUK, NEGIDA & AHMED, 2016). Estudos recentes sugerem ainda que espécies de mosquitos *Culex* são potenciais vetores do vírus, ainda que a comprovação da infecção permaneça obscura (GUO *et al.*, 2016). Um desses trabalhos sugere que fêmeas de *Culex pipiens quinquefasciatus* expostos oralmente à ZIKV apresentam o vírus na saliva 8 d.p.i e são capazes de transmitir o vírus para camundongos através da picada (GUO *et al.*, 2016). No entanto, outro sugere que o mosquito é incapaz de participar na rápida propagação do vírus 21 dias após uma refeição de sangue infeccioso ou até 14 dias após a inoculação intratorácica (AMRAOUI *et al.*, 2016).

O sucesso da infecção e o estabelecimento de surtos podem ser consequência do tropismo do vírus por diversos órgãos, permitindo a sua estabilidade em diferentes fluidos corporais pelos quais podem ser isolados. Esses fluidos, portanto, podem ser consideradas possíveis rotas de transmissão da infecção homem-homem, independente do vetor invertebrado (MINER & DIAMOND, 2017).

Desde a ocorrência dos recentes surtos em diversos países, incluindo o Brasil, diferentes formas de transmissão foram suspeitas, sendo muitas delas confirmadas ou ainda permanecendo em investigação (**figura 5**). Inúmeros casos de transmissão sexual foram descritos através do isolamento de RNA viral em sêmen e esperma de indivíduos infectados, sendo em alguns casos também isolado partículas infecciosas do vírus (BARZON *et al.*, 2016; CALVET *et al.*, 2016; CHIBUEZE *et al.*, 2016). Além disso, como formas independentes da transmissão sexual já foram descritas transmissões materno-fetal, pós-transfusão e pós-transplante (MARTINES *et al.*, 2016, CALVET *et al.*, 2016, MLAKAR *et al.*, 2016, D'ORTENZIO *et al.*, 2016; DAVIDSON *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016; NICASTRI *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2015; BARJAS-CASTRO *et al.*, 2016; SWAMINATHAN *et al.*, 2016). Ainda, RNA virais já foram encontrados em fluidos como saliva, lágrimas e urina (MINER & DIAMOND, 2017; GOURINAT *et al.*, 2015).

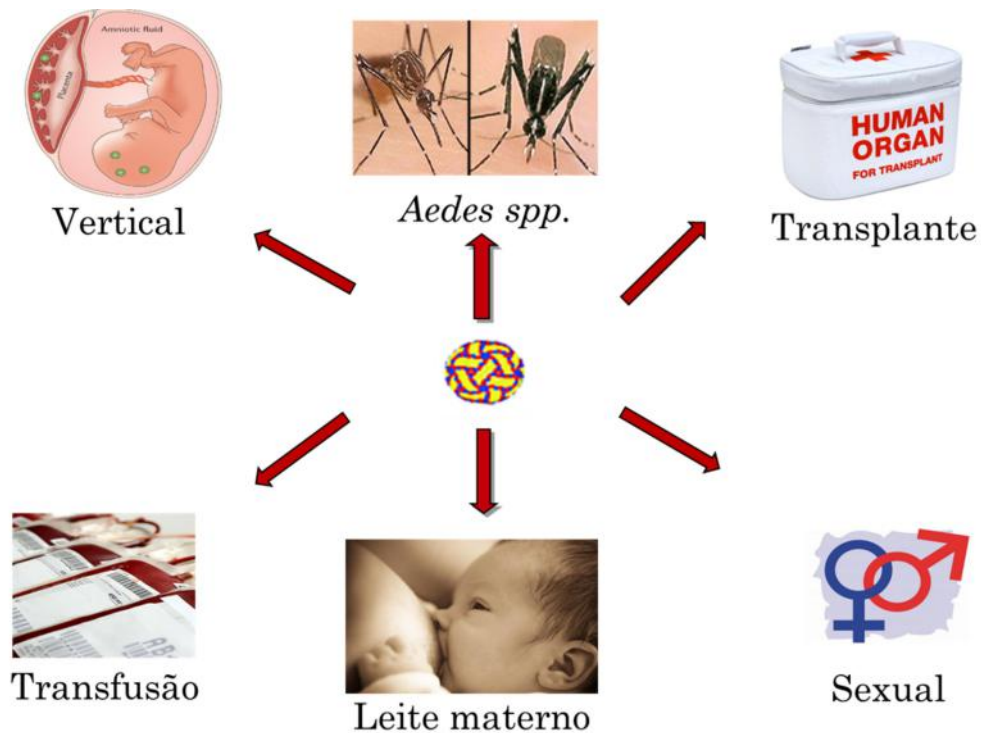


Figura 5: Rotas de transmissão do ZIKV. Rotas de transmissão do Zika vírus que inclui a picada do mosquito, transmissão materno-fetal, sexual e transfusão sanguínea e por transplante.

Mesmo diante de inúmeras formas de transmissão, a materno-fetal vem sendo a mais amplamente estudada, por ser responsável por diversos comprometimentos neurológicos no embrião/feto ou no bebê após o nascimento. A infecção transplacentária durante a gestação, principalmente no primeiro trimestre, pode acarretar em abortos e natimortos ou levar à síndrome congênita do Zika vírus relacionado com sinais e sintomas neurológicos graves, tais como microcefalia, lisencefalia e alterações no corpo caloso (OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2016; WANG & LING, 2016; WU *et al.*, 2016). Já em adultos, manifestações graves como mielite aguda, meningoencefalite, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e outras neuropatias vem sendo relacionados à infecção pelo ZIKV (CARTEAUX *et al.*, 2016; MECHARLES *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2016).

A SGB é caracterizada como doença autoimune aguda decorrente da desmielinização temporária dos nervos periféricos, geralmente, associada à precedência de outras infecções (YUKI & HARTUNG, 2012). No caso do ZIKV, inúmeros casos de SGB foram concomitantes ao surto do vírus, despertando uma possível associação da infecção com a

doença (ARAÚJO *et al.*, 2016). Além disso, sugere-se que epítomos de algumas proteínas do vírus apresentem estruturas similares a antígenos humanos, desencadeando a doença. Esses dados em conjunto reforçam a possível associação de ZIKV e SGB (LUCCHESI & KANDUC, 2016).

Pouco se sabe sobre a patogênese do vírus, entretanto, evidências sugerem que fibroblastos e células dendríticas (DCs) na porta de entrada são susceptíveis e permissivos a infecção através da interação do vírus com DC-SIGN ou receptores da família fosfatidil serina, sendo responsáveis pela replicação inicial do vírus logo após a picada do mosquito infectado (HAMEL *et al.*, 2015). Como uma infecção viral clássica, sugere-se que esses vírus atinjam, posteriormente, linfonodos regionais e se disseminem pela corrente sanguínea levando a viremia primária (SANTOS; ROMANOS & WIGG, 2015). Os vírus podem, então, atingir órgãos e tecidos amplificando a carga viral, permitindo a infecção de outros indivíduos e mosquitos.

1.4.1. Zika vírus e microcefalia - Síndrome Congenita do Zika

Em outubro do ano de 2015 houve um aumento marcante do número de casos de microcefalia congênita reportados pelo estado de Pernambuco, na região Nordeste do Brasil (OLIVEIRA, 2015). O aumento dessa malformação neurológica passou a ser confirmada da associação da infecção pelo ZIKV a partir de resultados de RT-PCR positivos em líquido amniótico de mães que apresentaram manifestações clínicas semelhantes à infecção pelo vírus da Zika, cujos filhos nasceram microcefálicos (OLIVEIRA MELO, *et al.*, 2016; CALVET, *et al.*, 2016). Desde então, novos e aumentados espectros de manifestações clínicas passaram a ser reportados associando a malformação congênita com a infecção viral. Um caso bastante marcante permitiu melhores evidências da suspeita associação ao detectar o genoma do vírus no cérebro de um feto microcefálico e em tecidos da gestante (MLAKAR, *et al.*, 2016). Posteriormente, evidências foram confirmadas pela detecção de IgM específica para ZIKV em soros e líquido cefalorraquidiano de outros neonatos microcefálicos (ARAÚJO *et al.*, 2016; CORDEIRO *et al.*, 2016). O aumento do número dos casos de microcefalias associados a infecção por ZIKV, assim como suspeitas de transmissão vertical do vírus fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretasse estado de emergência nacional e internacional em 2015 (HEYMANN *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; WHO, 2016; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2016; MILLICHAP, 2016).

A microcefalia é caracterizada pela diminuição do perímetro cefálico (menor que 32 cm), o que resulta em uma cabeça mal desenvolvida e menor do que o normal (TANG, 2016). O

acompanhamento da medição do perímetro cefálico durante a gestação pode facilitar o diagnóstico de casos da doença (PETERSEN *et al.*, 2016). Essa malformação é denominada pós-natal quando ocorre posterior ao nascimento e congênita quando ocorre *in útero*, durante o desenvolvimento do feto (PASSEMARD *et al.*, 2013).

No que se referem à microcefalia congênita, diversos outros fatores também podem levar ao desenvolvimento da neuropatia, tais como mutações genéticas, agentes teratogênicos medicamentosos e até mesmo outras lesões neurológicas primárias (DAHLGREN & WILSON, 2001; VON DER HAGEN *et al.*, 2014). Todos esses fatores podem fazer com que a microcefalia se desenvolva diminuindo conexões sinápticas e processos dendríticos, ou interferir negativamente no processo de neurogênese (WHOODS, 2004). No caso da infecção pelo ZIKV, evidências no prejuízo da formação neuronal já foram demonstradas em experimentos *in vitro* utilizando organoides cerebrais (GARCEZ *et al.*, 2016).

De acordo com as análises epidemiológicas, da SE 45/2015 até a SE 2/2017, foram notificados mais de 10 mil casos de neonatos e crianças relacionadas com infecção congênita durante a gestação (**Figura 6**). Do total, mais de 2 mil casos foram confirmados, concentrados predominantemente na região nordeste do país, em maior número no estado de Pernambuco seguido da Bahia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

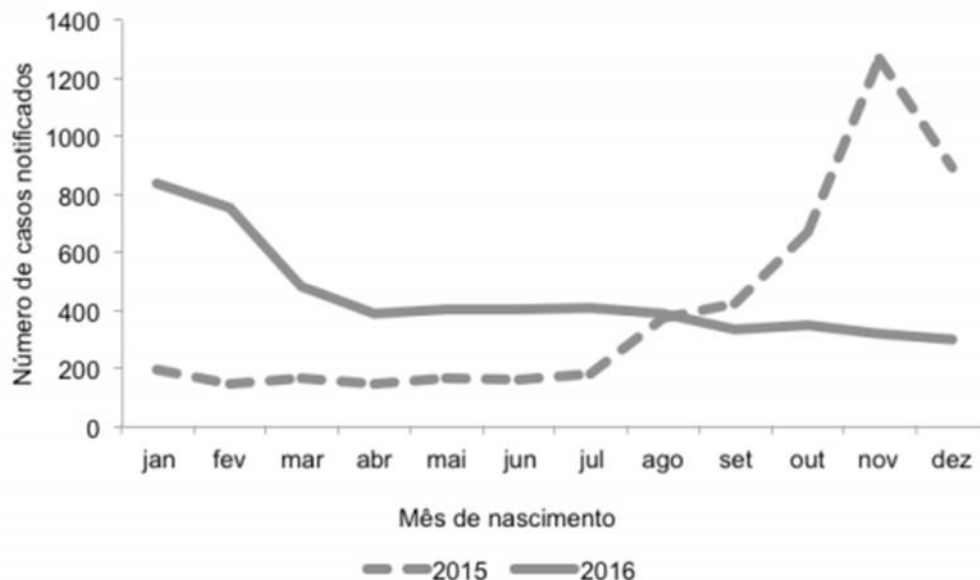


Figura 6: Casos notificados de ZIKV relacionados com alterações congênitas. Casos notificados de alterações devido a infecções congênitas de crianças e neonatos possivelmente relacionadas à infecção por ZIKV, por mês de nascimento, SE 1/2015 - SE 52/2016, Brasil, 2015-2016 (n=10.166). Fonte: http://combateaedes.saude.gov.br/images/informes/2017_informe_epidemiologico_SE02.pdf

Apesar de a microcefalia ter sido a seqüela mais comumente associada à infecção pelo ZIKV durante a gestação, a síndrome congênita do Zika abrange diversas outras alterações no feto/recém-nascido principalmente no SNC. Ventriculomegalia, anormalidades no corpo caloso e na migração cortical também podem ser frequentemente observadas. Além disso, calcificações na junção matéria cinzenta-matéria branca, ganglios basais e tálamo podem ocorrer em muitos casos (OLIVEIRA-SZEJNFELD *et al.*, 2016), assim como hidrocefalia e artrogripose (XAVIER-NETO *et al.*, 2017).

1.4.2. Células primárias e linhagens celulares susceptíveis a infecção por ZIKV *in vitro*

A disseminação do ZIKV nos últimos anos com o natural aumento do número de grupos de pesquisa com diferente expertise investigando a biologia viral e patogênese da doença despertou a necessidade de uma avaliação sistemática da susceptibilidade de diferentes tipos celulares por ZIKV, em dois sentidos distintos e importantes: o primeiro no que se refere à modelos celulares para o estudo da patologia do vírus; e o segundo no que se refere ao estabelecimento de linhagens celulares eficientes para propagar e titular o vírus a fim de obter estoques virais com títulos altos e reprodutíveis para dar prosseguimento aos estudos em diferentes modelos celulares, o que é um dos objetivos do presente trabalho.

Um dos primeiros estudos realizados em cultura de células utilizando o ZIKV MR766 e outras arboviroses africanas foi desenvolvido em 1976, através de infecção em células epiteliais renais de macaco Rhesus (LLC-MK2) e titulação por ensaio de placa em células de rim de macaco verde africano (VERO) (WAY, BOWEN & PLATT, 1976). Entretanto, os estudos passaram a ser mais intensos após o aumento dos casos de infecção pelo vírus, onde se buscou compreender a relação vírus-hospedeiro humano com maiores detalhes. Nesse momento estudos da infecção por ZIKV em diferentes células mostraram que fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas são permissíveis à infecção (HAMEL *et al.*, 2015). Além disso, inúmeros outros tipos celulares foram utilizados tanto para estudo da infecção quanto para isolamento do vírus. Em um trabalho publicado na Virologica Sinica em abril de 2016, mostrou que amostras de soros de pacientes chineses infectados com o vírus da Zika em quantidades indetectáveis de RNA foram utilizadas para o isolamento viral em células de glândula de mosquito C6/36 e VERO, com posterior confirmação por imunofluorescência nas mesmas. Esse trabalho foi o primeiro a sugerir que células C6/36 poderiam ser utilizadas como modelo para amplificação de carga viral de espécimes humanos (DENG *et al.*, 2016). Estudos posteriores confirmaram esses resultados e

mostraram que células VERO e células de rim de hamster neonato (BHK) são infectadas pelo vírus da Zika, sendo esta última pouco eficiente para replicar o vírus (BARRETO-VIEIRA *et al.*, 2016; NIKOLAY *et al.*, 2017).

Somado ao desenfreado aumento das infecções por ZIKV, a relação da arbovirose com crescentes casos de microcefalia permitiram estudos da permissividade de células e precursores neuronais como alvo direto do vírus, o que poderia explicar de forma mais fidedigna a associação da infecção com os casos de malformação cerebral em recém-nascidos. Nesse aspecto, células progenitoras neuronais corticais humanas, derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas, se mostraram permissivas a infecção por ZIKV, acarretando em indução de morte e desregulação do ciclo celular. Isso poderia interferir negativamente no crescimento dessas células, como observado na malformação congênita possivelmente induzida pelo vírus (TANG *et al.*, 2016). Igualmente, organóides cerebrais e neuroesferas infectadas com o vírus parecem ter menor viabilidade e diminuição na taxa de crescimento, se relacionando novamente ao comprometimento da neurogênese e do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) durante a infecção *in útero* (GARCEZ *et al.*, 2016). Além disso, células estaminais neuronais e astrócitos podem ser infectados pelo vírus, com maiores ou menores comprometimentos na viabilidade de acordo com a virulência da cepa (SIMONIN *et al.*, 2016).

De fato, o isolamento do vírus em diferentes fluídos corporais e tecidos humanos parecem corroborar com a susceptibilidade e/ou permissividade de diversos tipos celulares para suportar a infecção e permitir a replicação viral. Células epiteliais pulmonares A549 são eficientemente infectadas por ZIKV, podendo sofrer apoptose mitocondrial por ativação de caspases 3 e 9. Além disso, a infecção induz a secreção de IFN- β e citocinas pró-inflamatória como IL-1 β (FRUMENCE *et al.*, 2016). Células endoteliais (ECs), progenitores neuronais primários de fetos humanos e igualmente podem suportar a replicação viral estabelecendo prova de conceito de que a neuropatia fetal pode estar relacionada com a patologia induzida pelo vírus da Zika (LIU *et al.*, 2016; HANNERS *et al.*, 2016).

No que se refere à transmissão vertical, o vírus é capaz de infectar citotrofoblastos, células endoteliais, fibroblastos, células de Hofbauer em vilosidades coriônicas, células epiteliais amnióticas e progenitores de trofoblasto em membranas amniocoriônicas através da expressão de alguns receptores como o de fosfatidil serina (AXL), o que mostra que o vírus possui um tropismo bastante amplo por células primárias da placenta e explantes placentários (TABATA *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos já mostraram uma visão geral sobre a infecção de ZIKV em inúmeras linhagens celulares, como o estudo realizado por Barr e colaboradores onde 17 linhagens celulares divididas em epiteliais e fibroblastos de diferentes tecidos foram testadas para a infecção por alguns flavivírus, incluindo o vírus da Zika (BARR *et al.*, 2016). Ainda, linhagens de células gliais como a U87-MG também são infectadas pelo vírus e induzem resposta inflamatória com ativação de inflamossomas (TRICARICO *et al.*, 2017).

1.5 Zika vírus e resposta imune

A infecção pelo ZIKV e sua interação com a imunidade do hospedeiro e a busca de mecanismos imunes associados à proteção ou progressão da infecção tem sido massivamente investigada. Já foi descrito que o ZIKV é capaz de infectar células da pele humana, tais como fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas, através da utilização de receptores como DC-SIGN, AXL e Tyro3. Essa infecção é capaz de induzir a expressão do receptor Toll-like 3 (TLR3), RIG-I e MDA5, e de genes estimulados por interferon, como OAS2, ISG15 e MX1 (HAMEL *et al.*, 2015). Por outro lado, foi demonstrado que ZIKV é capaz de evadir a resposta induzida por interferons do tipo I, em células humanas, através da degradação de STAT2 (GRANT *et al.*, 2016).

Estudos com células primárias humanas sugeriram que a expressão e secreção de interferons do tipo III protegem trofoblastos da infecção (BAYER *et al.*, 2016). Outros estudos, no entanto, indicam que trofoblastos são infectados e capazes de produzir partículas infecciosas (TABATA *et al.*, 2016). Dados do nosso grupo demonstraram, ainda, que explantes de placenta infectados *ex vivo* apresentam aumento da expressão de IL-1b, IL-10, IL-6, IFN- γ , TNF- α . No entanto, a expressão de interferons do tipo I e III não apresentou aumento significativo (RIBEIRO *et al.*, submetido)

Análise da infecção e ativação de células circulantes tem sugerido que monócitos são as principais células infectadas (MICHELMAYR *et al.*, 2017; FOO *et al.*, 2017). Foi sugerido, ainda, que a infecção pode induzir uma diferenciação dessas células para um fenótipo M2, que estaria associado ao desenvolvimento de sintomas e complicações neonatais (FOO *et al.*, 2017). Além disso, em pacientes não gestantes, a infecção pelo ZIKV pode levar a ativação de células T polifuncionais (Th1, Th2, Th9 e Th17), acompanhado pelo aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas durante a fase aguda da infecção, e posterior decréscimo na fase de convalescência (TAPPE *et al.*, 2016).

As limitações para um estudo detalhado da patogênese da zika e papel dos diferentes compartimentos da resposta imune em humanos levou a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais, particularmente modelos murinos, como detalhado a seguir.

1.5.1. Infecção e análise da resposta imune em modelos *in vivo*

O estabelecimento de modelos animais imunocompetentes e imunodeficientes é extremamente importante para o estudo de inúmeras doenças humanas. A associação da infecção por ZIKV com diferentes manifestações clínicas em neonatos e adultos, cuja patogênese ainda não foi elucidada, levou inúmeros pesquisadores a estudar e compreender a relação vírus-hospedeiro humano utilizando modelos animais como estratégia (MLAKAR *et al.*, 2016; CAO-LOMEAU *et al.*, 2016; SAMUEL & DIAMOND, 2005).

Um dos trabalhos pioneiros no estudo da infecção de ZIKV em modelo animal realizou passagens sucessivas do vírus em cérebros de camundongos suíços para adquirir o vírus adaptado e mostrou que camundongos adultos ou neonatos imunocompetentes infectados intracranialmente com a cepa MR766 adaptada desenvolviam patologia neurológica. No entanto, esses mesmos animais inoculados com o vírus por outras vias não apresentavam a doença (DICK, KITCHEN & HADDOW, 1952).

Outros estudos utilizando camundongos imunocompetentes como C57BL/6, BALB/c e CD-1 inoculados com ZIKV por via diferente da intracerebral tem mostrado que estes, dificilmente são capazes de desenvolver doença neurológica e possuem carga viral muitas vezes indetectável (LAROCCA *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016). Com isso, muitos pesquisadores passaram a buscar modelos animais imunodeficientes que pudessem sustentar a infecção e desenvolver a doença. Nesse aspecto, animais como A129, deficientes na expressão do receptor de interferons do tipo 1 (Ifnar^{1-/-}), ou AG129 duplo deficiente na expressão do receptor de interferon do tipo 1 e do tipo 2 (Ifnar e Infgr^{-/-}) mostraram-se modelos promissores para o estudo da doença. Nesses estudos a taxa de sobrevivência foi dependente da idade dos animais: letalidade mais acentuada ou exclusiva em animais mais jovens quando comparado a animais mais velhos (LAZEAR *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016). De fato, neonatos de linhagens murinas imunocompetentes também podem ser utilizados como modelo de estudo da infecção e desenvolvimento de doença neurológica (MORRISON & DIAMOND, 2017).

O papel da resposta via interferons do tipo I foi claramente evidenciado em modelos experimentais murinos deficientes na expressão de receptor para essas citocinas, como será detalhado adiante. Como já mencionado, camundongos A129 são sensíveis a infecção

apresentando perda de peso, carga viral sistêmica e disseminada para SNC, e letalidade após a infecção com ZIKV, utilizando diferentes vias de inoculação (Lazear, et al., 2016). Nesse trabalho, foi demonstrado, ainda, que animais deficientes em irf 3, 5 e 7 também foram mais sensíveis à infecção por ZIKV, confirmando o papel da resposta mediada por IFN do tipo I na proteção. Camundongos *Stat2*^{-/-} são também altamente suscetíveis à infecção por ZIKV, com ampla disseminação do vírus no sistema nervoso central (SNC), gônadas e outros órgãos viscerais, além de apresentarem sintomas neurológicos, associados com elevada produção de citocinas inflamatórias e marcadores de infiltração celular no cérebro. Esses sintomas são curtos e seguidos de letalidade em animais infectados com uma cepa africana de ZIKV (TRIPATHI *et al.*, 2017).

Além dos IFN do tipo I, a resposta mediada por IFN- γ parece contribuir para proteção a infecção, uma vez que camundongos AG129 desenvolvem uma infecção mais severa quando comparada aos outros modelos (ROSSI *et al.*, 2016). Além disso, camundongos C57BL/6-IFNAR KO infectados por via intracerebral desenvolveram paralisia bilateral e óbito até seis dias pós-infecção, apresentando infiltrado de neutrófilos, macrófagos e aumento de IL-1, IL-6 e Cox2 no SNC. Animais imunocompetentes da mesma linhagem, por outro lado, apresentaram sintomas autolimitantes de doença neurológica com infiltrado de células TCD8⁺ e aumento da expressão de IFN- γ no cérebro (MANANGEESWARAN, IRELAND&VERTHELYI, 2016). Outro estudo demonstrou que células T CD8⁺ obtidas de camundongos previamente infectados foram capazes de proteger camundongos imunodeficientes da infecção. A transferência dessas células reduziu a carga viral em tecidos específicos, e sua depleção levou ao aumento da mortalidade dos animais, mostrando o papel importante dessas células T CD8⁺ na proteção contra a infecção por ZIKV (ELONG NGONO *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que, em células humanas, o ZIKV escapa da resposta mediada por IFN do tipo I, portanto, a resposta mediada por linfócitos T e B deve ter, de fato, um papel primordial no controle da infecção. Um estudo recente sugeriu que no modelo murino, a resposta adaptativa é requerida na ausência de resposta mediada por IFN. Foi demonstrada nesse trabalho que, camundongos RAG ^{-/-} não sucumbem a infecção, no entanto, esses mesmos animais tratados com anticorpos neutralizantes anti-IFNAR apresentam doença mais severa do que animais wt tratados com os mesmos anticorpos, sugerindo que uma vez ausente ou ineficiente a resposta IFN I, a resposta adaptativa torna-se extremamente importante para controlar a propagação viral em diversos tecidos (WINKLER *et al.*, 2017).

Um estudo recente investigou a resposta de células T em linhagens de camundongo imunocompetente - C57BL/6, a qual apresenta infecção autolimitante e associadas a baixa morbidade. Nesse modelo, foi observado que as células T CD4⁺ efetoras polarizaram para um fenótipo Th1, com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 após restimulação *ex vivo*. Células T CD8⁺ que entraram em contato com o antígeno exibem um fenótipo efetor ativado, produzindo citocinas efetoras e moléculas citolíticas para combater a infecção (PARDY *et al.*, 2017).

Embora alguns estudos utilizando modelos animais tenham avançado consideravelmente, no entendimento da patogênese da infecção pelo vírus da Zika, muitos pontos ainda precisam ser elucidados, ainda que três aspectos gerais venham sendo investigados: doença em animais imunocompetentes, infecção de gestantes e comprometimento em fetos.

1.5.2. Modelos experimentais de infecção por ZIKV em gestantes

Sabe-se que uma gama de células maternas e fetais pode sustentar a replicação de ZIKV, tais como macrófagos e fibroblastos teciduais, células mesenquimais do cordão umbilical, trofoblastos e células de Hofbauer e é proposto que o efeito citopático resultante da infecção gere lesão tecidual, o que pode estar associado aos danos congênitos, muitas vezes irreversíveis (COSTA *et al.*, 2016).

Diante da limitação de estudos em humanos para compreender a interação ZIKV e gestação, tornou-se necessário à utilização de modelos animais padronizados para compreender os mecanismos de patogênese do vírus. Pelo fato de haver pouca disponibilidade de tais modelos, há grandes dificuldades para solucionar os enigmas mecanísticos da infecção congênita. Nesse aspecto, alguns trabalhos recentes têm abordado a infecção por ZIKV em linhagens de camundongos imunocompetentes e imunodeficientes para melhor compreensão das consequências da infecção durante a gestação.

Fêmeas gestantes imunocompetentes C57BL/6 e SJL ou imunocomprometidas como A129 foram utilizados para o estudo da infecção congênita (CUGOLA, *et al.*, 2016; MORRISON & DIAMOND, 2017). A infecção com ZIKV em camundongos gestantes C57BL/6 ou SJL com idade entre 6 e 8 semanas levou a infecção de fetos somente na última linhagem, acarretando na restrição de crescimento intra-uterino e no estabelecimento de sinais de microcefalia como observado nos casos humanos (CUGOLA *et al.*, 2016). Animais SJL mesmo considerados imunocompetentes são mais sujeitos à encefalomielite experimental e

aumento da incidência do linfoma de Hodgkin, o que foge um pouco do conceito de imunocompetência (SPINDLER *et al.*, 2001; MATSUSHIMA & STOHLMAN, 1991).

A inoculação direta na parede uterina de camundongos gestantes CD1 (E) 10 com diferentes cepas de ZIKV diminuiu a viabilidade fetal e aumentou a infecção de tecidos na placenta e feto. Inflamação e disfunção placentária e redução da espessura cortical do cérebro neonatal foram eventos observados nesse modelo de infecção (VERMILLION *et al.*, 2017).

A morte de fetos heterozigotos oriundos do cruzamento de camundongos fêmeas A129 (*Ifnar*^{-/-}) com machos C57BL/6 também foi observada quando fêmeas foram inoculadas por via subcutânea no dia embrionário 6.5 (E6.5) ou E7.5. Nesse modelo RNA viral foi detectado na placenta e no cérebro dos fetos, em trofoblastos placentários e fetais, em E13.5 e E15.5, sugerindo uma possível rota de infecção transplacentária (MINER *et al.*, 2016). O tratamento das gestantes com anticorpos anti-*Ifnar1* 1 dia antes da infecção gerou efeitos semelhantes, com excessão da morte fetal, indicando a importância dessa via na proteção contra a transmissão vertical e/ou estabelecimento de doença congênita (MINER *et al.*, 2016). De fato, já é claro que o estado imunológico é alterado durante a gravidez e que essa alteração modifica o perfil pró e anti-inflamatório de diversas formas, fazendo com que a gestação potencialize inúmeras infecções virais. Da mesma forma, essas alterações devem contribuir para a susceptibilidade e transmissão congênita do ZIKV, no entanto, esses mecanismos ainda precisam ser investigados (KING *et al.*, 2017).

Já foi visto que respostas de células T CD8⁺ são reduzidas em camundongos gestantes infectados com ZIKV quando comparado com animais não gestantes, sugerindo que a diminuição da resposta mediada por células pode ser um quesito para facilitar a propagação do vírus e infecção do feto (WINKLER *et al.*, 2017).

Embora já se tenha outros estudos semelhantes utilizando modelos gestantes de camundongos da mesma ou de outras linhagens, ainda permanece obscura a compreensão do perfil imunológico inflamatório no que se refere à susceptibilidade ou resistência à infecção por ZIKV. Trabalhos tem sugerido que a ativação imune causada pela infecção por ZIKV no ambiente uterino também pode interferir no desenvolvimento fetal (ORNELAS *et al.*, 2017), e por isso, resposta imune de animais imunocomprometidos e imunocompetentes além de respostas em gestantes e não gestantes ainda precisam ser investigados minuciosamente.

2. JUSTIFICATIVA

O massivo aumento da infecção pelo ZIKV foi recentemente considerado um problema de saúde global. Nesse curto período de tempo, inúmeros virologistas e pesquisadores com diferentes conhecimentos se reuniram em um enorme esforço para avançar com as pesquisas, a fim de entender melhor como o vírus se comporta, replica e desencadeia todos os sintomas e comprometimentos graves da doença. Uma das limitações iniciais para o estudo da infecção por ZIKV era o estabelecimento de técnicas padronizadas e universais para produção, propagação e titulação viral em sistemas *in vitro* para acelerar as pesquisas e obter rendimento de estoques de ZIKV de alto título em cultura de células. Na primeira parte do projeto, buscamos estabelecer essas técnicas, visando à obtenção de altos títulos de estoques virais de forma uniforme e reprodutível.

Para os estudos de patogênese da infecção, além da determinação dos tipos celulares susceptíveis, é necessário o estabelecimento de um modelo experimental *in vivo*, que permita avaliar o papel de diferentes componentes do hospedeiro na doença ou proteção, incluindo componentes da resposta imunitária, barreira hemato encefálica e função placentária. Além disso, o curso de infecção em gestantes parece ser diferente de não gestantes. No último caso, a infecção sistêmica parece ser rápida e autolimitada. Enquanto que, no primeiro, o vírus atravessa a barreira placentária em momento ainda não conhecido e se estabelece no feto por tempo ainda não determinado, levando as alterações mais severas associadas a essa infecção. O estabelecimento de modelos de infecção em camundongos imunocompetentes e imunodeficientes, gestantes e não gestantes pode contribuir para a compreensão de pelos menos parte desses fenômenos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver protocolos padronizados de propagação e titulação de ZIKV *in vitro* e estabelecer modelos animais imunocompetentes e imunodeficientes gestantes ou não para estudo do perfil imunológico diante da patogênese da infecção pelo vírus.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar as condições ótimas para a avaliação do título viral por ensaio de plaque;
- Testar a susceptibilidade e permissividade de diferentes linhagens celulares na infecção pelo ZIKV;
- Comparar as diferentes linhagens celulares para o estabelecimento das condições ótimas para propagação das linhagens asiática e africana de ZIKV, testando diferentes tempos e multiplicidades de infecção (MOI);
- Estabelecer um modelo de infecção sistêmica por ZIKV em diferentes linhagens de camundongos;
- Estabelecer um modelo de infecção de gestantes com ZIKV, utilizando camundongos imunodeficientes e imunocompetentes, através da análise da carga viral em diferentes tecidos da mãe e no feto;
- Comparar a resposta imune sistêmica em gestantes e não gestantes da mesma linhagem e relacionar esse perfil com o perfil inflamatório na placenta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

Células C6/36 (linhagem celular da glândula de mosquito *Aedes albopictus*) cedidas gentilmente pela Dra. Andrea Tompson da Poian (Instituto de Bioquímica Médica, Ibm, UFRJ) foram mantidas em meio Leibovitz (L-15 - GIBCO), pH 7,3 suplementado com 3% de triptose (GIBCO), bicarbonato de sódio 7,5% (ISOFAR), L-glutamina 2% (Glutamax – GIBCO), aminoácidos não essenciais 0,2mM (BAKTRON MICROBIOLOGIA) e 1% de gentamicina (GIBCO - 10µg/ml), acrescido de 5% de Soro Fetal Bovino (SFB – GIBCO) em ambiente úmido a 28°C em incubadora B.O.D. (SOLAB).

HBMECs (linhagem celular de endotélio microvascular cerebral humano) gentilmente cedidas pelo Dr. Dennis J. Grab (The Johns Hopkins University, MD, USA) foram mantidas em meio 199 (M199 - GIBCO), pH 7,4, acrescido de 10% de SFB (GIBCO) a 37°C em ambiente com 5% de CO₂.

BHK-21 (linhagem celular de rim de *hâms ter bebê*) serão mantidas em meio α -MEM (*Alpha-Minimum Essential Medium*) (Applied Biosystems, EUA) e suplementado com 1% de gentamicina (GIBCO - 10µg/ml), acrescido de 10% de SFB (GIBCO) a 37°C em ambiente com 5% de CO₂.

Vero (obtidas do ATCC[®] CCL81[™]) (linhagem celular de epitélio de rim de macaco verde africano) foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – ThermoFisher, EUA*), pH 7,2, suplementado com 5% de SFB (GIBCO), 0,75% de bicarbonato de sódio e 1% de gentamicina (GIBCO - 10µg/ml) em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

LLC-MK2 (ATCC[®] CCL-7[™]) (célula epitelial de rim de macaca mulata) e A549 (ATCC[®] CCL-185[™]) (carcinoma epitelial de pulmão) foram mantidas em meio DMEM high glucose (*ThermoFisher, EUA*), suplementado com 2% de L-glutamina (*ThermoFisher, EUA*) e 5% de soro fetal bovino (*Life Technologies, Grand Island, NY*) nas células LLC-MK2 e 10% nas células A549 a 37°C em ambiente com 5% de CO₂.

U87-MG (ATCC[®] HTB-14[™]) (glioblastoma humano) e C6 (tumor glial de rato) foram cultivadas com DMEM high glucose (*ThermoFisher, EUA*) suplementado com 2% de L-glutamina, 1 mM de aminoácidos não essenciais (*ThermoFisher, EUA*) e 10% de SFB (GIBCO), mantidas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂.

As condições de cultivo de todas as linhagens celulares sem micoplasma foram rotineiramente certificadas por imunofluorescência e PCR (FRESHNEY, 2005).

4.2. Vírus

ZIKV, da cepa MR766 (ZIKV-AFR, ATCC VR1838) foi gentilmente fornecida pelo Dr. Amilcar Tanuri (Instituto de Biologia, UFRJ) após seis passagens em células Vero. O ZIKV-BR_{PE} foi isolado de um caso febril no estado de Pernambuco, Brasil e foigentilmente fornecido pelo Dr. Ernesto T.A. Marques Jr. (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, PE), após três passagens em células C6/36 (Genebank KX197192; DONALD *et al.*, 2016). Após duas passagens em nosso laboratório, foi realizada uma análise metagenômica da amostra, onde foi confirmada sua sequencia e ausência de contaminação com outros vírus. ZIKV-BR_{SP} foi distribuído como parte da ZIKA FAPESP NETWORK e gentilmente fornecido pelo Dr. Mauricio L. Nogueira (FAMERP, SP) após quatro passagens em células C6/36 (FARIA *et al.*, 2016).

4.3. Propagação em cultura de células

As células foram cultivado “overnight” nos seus respectivos meios de cultura e suplementos para adesão completa, até atingir cerca de 70% de confluência. Em seguida, o meio metabolizado foiremovido da garrafa e as células lavadas com PBS 1X (*phosphate buffered saline* [NaCl 136 mM; KCl 2,6 mM; Na₂HPO₄ 11,6 mM; KH₂PO₂ 2,3 mM]) (ISO FAR) para a remoção de resíduos de meio metabolizado e SFB. Cada tipo de célula foi infectada com as diferentes amostras de ZIKV, utilizando MOI de 0,01 a 0,25, em 5 mL de meio de cultura na ausência de SFB, durante 90 min, sob agitação suave, para adsorção do vírus. Os meios foram removidos e substituídos pelo meio de cultura apropriada, suplementado com SFB a 2% (células C6/36, Vero, HBMEC, LLC-MK2) ou SFB 7% (células A549, C6, HeLa). O efeito citopático (CPE) foi avaliado diariamente e as células e os sobrenadantes foram coletados quando se detectou cerca de 70% de CPE ou nos momentos indicados. Para realizar análises temporais da replicação de ZIKV em células VERO e C6/36, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos, centrifugados, filtrados em filtros de 0,22 mm e armazenados na temperatura de -80°C. A cada coleta temporal foiadicionado um meio fresco proporcional.

4.4. Titulação por ensaio de placa

As amostras obtidas em diferentes períodosde tempo após a infecção foram tituladas por ensaio de placa. As células Vero foram plaqueadas, em placas de 24 poços, à concentração de 4×10^4 células por poço em meio DMEM (GIBCO) suplementadas com 5% de SFB (GIBCO),

1% de gentamicina (GIBCO - 10µg/ml) e cultivadas overnight para a adesão completa a 37°C com 5% de CO₂. Então, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com diluições em série (base 10) de vírus em meio isento de SFB. Após 90 min de incubação sob ligeira agitação, o meio foi removido, as células lavadas com PBS 1x e cultivadas com diferentes concentrações de carboxi-metil-celulose (CMC), suplementadas com 1% de SFB (GIBCO). Após 5 dias, as células foram fixadas “overnight” com formaldeído a 4% e coradas com 1% de cristal violeta em 20% de metanol (ISO FAR) durante 1 h. As placas foram contadas e o rendimento do vírus foi calculado e expresso como unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ml).

4.5. Análise da replicação viral por qRT-PCR

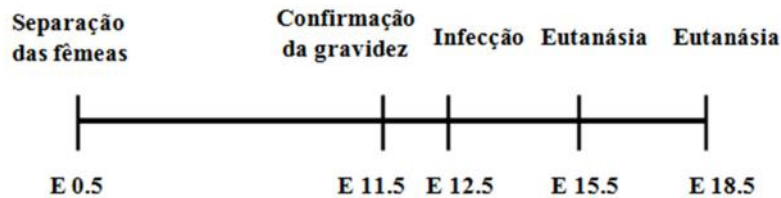
As células C6/36 foram infectadas com o MOI indicado de ZIKV-BR_{PE} durante 7 dias, como descrito. O meio condicionado foi colhido e o RNA extraído utilizando o reagente TRIZOL (*Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 300 µl de sobrenadante e 1 ml de Trizol. O tratamento com DNase I (*Ambion, Thermo Fischer*) foi realizado para prevenir a contaminação por DNA genômico e o cDNA foi sintetizado utilizando o kit cDNA high capacity (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante, submetendo as amostras ao seguinte ciclo: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Os cDNA foram submetidos a PCR quantitativa em tempo real utilizando um sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus e Reagentes Taqman Master Mix (*Applied Biosystems*), utilizando iniciadores e sonda específicos para a sequência da proteína E, como descrito em outro trabalho (LANCIOTTI et al., 2008), submetendo as amostras ao seguinte ciclo: 50°C por 2 minutos, 40x(95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto). Os sobrenadantes foram titulados por ensaio de placa para realizar uma curva padrão através de diluição seriada e determinar a PFU equivalente das amostras.

4.6. Camundongos

Todos os experimentos animais foram realizados em colaboração com a professora doutora Tânia Ortiga do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF com aprovação pelo comitê de ética animal sob protocolos n° 036/16 e no104/16, CEUA/UFRJ.

Fêmeas com idade entre 8 e 10 semanas das linhagens imunocompetentes C57Bl/6, B6/SJL, e da linhagem imunocomprometida A129 (nocautes para o gene *Ifnar1*) foram submetidas a citologia vaginal para determinação do período fértil e acasalamento. Em seguida, as fêmeas foram separadas dos machos no dia gestacional E0.5 e tiveram o peso

monitorado diariamente até E11.5 para confirmação da gravidez. No E 12.5 as fêmeas foram infectadas com ZIKV-BR_{PE}, sendo eutanasiadas no E 15.5 ou E 18.5 (referente a 3 ou 6 dias posterior a infecção), de acordo com o esquema abaixo:



4.7. Infecção e processamento por qRT-PCR dos tecidos dos animais

Na idade gestacional E12.5, fêmeas C57BL/6, B6SJL ou A129 (type-1 interferon receptor deficient mice) foram infectados com ZIKV-BR_{PE}, em diferentes concentrações, ou “MOCK” (sobrenadante de células não infectadas), por via intravenosa, pela base da cauda. Após diferentes períodos de tempo, foram coletados o sangue, baço e cérebro de camundongos gestantes e não gestantes da mesma linhagem e mesma idade. No caso das gestantes, foram coletados, ainda, placenta, sangue e feto (somente a cabeça). Esses tecidos foram macerados em meio RPMI (Gibco™ RPMI 1640 Medium) normalizado pelo peso do órgão, seguindo a proporção de 0,2 mg de tecido para cada 1ul de meio e representados por grama de tecido. O volume de macerado foi centrifugado a 4500g por 5 minutos para a retirada de resíduos de tecido e posteriormente 500ul do volume centrifugado foi utilizado para a extração de RNA como descrito anteriormente.

4.8. Análise do perfil de citocinas por qRT-PCR dos tecidos murinos

Na idade gestacional E12.5, fêmeas C57BL/6 e A129 (type-1 interferon receptor deficient mice) foram infectados com ZIKV-BR_{PE}, em diferentes concentrações (5×10^7 e 10^3 PFU, respectivamente), ou “MOCK” (sobrenadante de células não infectadas), por via intravenosa, pela base da cauda. Em 6 d.p.i foram coletados baço, placenta e feto de camundongos gestantes infectados e não infectados. Esses tecidos foram macerados em meio RPMI (Gibco™ RPMI 1640 Medium) normalizado pelo peso do órgão, seguindo a proporção de 0,2 mg de tecido para cada 1µl de meio e representados por grama de tecido. O volume de macerado foi centrifugado a 4500g por 5 minutos para a retirada de resíduos de tecido e posteriormente 500 µl do volume centrifugado foi utilizado para a extração de RNA como

descrito anteriormente. Esses tecidos foram utilizados para a realização da qRT-PCR para as seguintes citocinas: IL-1 β (FW-5'-GTA ATG AAA GAC GGC ACA CC-3', RV-5'-ATT AGA AAC AGT CCA GCC CA-3') IFN- γ (FW-5'-AGC AAC AGC AAG GCG AAA A-3', RV-5'-CTG GAC CTG TGG GTT GTT GA-3') TNF- α (FW-5'-CCT CAC ACT CAG ATC ATC TTC TCA-3', RV-5'-TGG TTG TCT TTG AGA TCC ATG C-3'), IL-10 (FW-5'-TAA GGG TTA CTT GGG TTG CCA AG-3', RV-5'-CAA ATG CTC CTT GAT TTC TGG GC-3') e IL-6 (FW-5'-TCA TAT CTT CAA CCA AGA GGT A-3', RV-5'-CAG TGA GGA ATG TCC ACA AAC TG-3').

4.9. Avaliação da viremia

Os animais infectados com ZIKV-BR_{PE} ou “MOCK” tiveram sangue coletado pela base da cauda em dois ou três momentos após a infecção: 4 h.p.i, 48 h.p.i e no momento do sacrifício (3 d.p.i ou 6 d.p.i). Os sangues foram coletados com a utilização de heparina como anticoagulante e posteriormente centrifugados a 400g por 30 minutos para a separação do plasma. A titulação foi feita em células Vero como descrito no item 4.4, utilizando o plasma dos diferentes tempos.

5.0. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 6.0 para windows, GraphPad Prism Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992-2012. As comparações entre os grupos e entre as diferentes linhagens de camungongos foram realizadas por One-way ANOVA e test T student; P valores <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Titulação de ZIKV-AFR₇₆₆ e ZIKV-BR_{PE} em células Vero

Para o estudo da biologia do ZIKV é essencial que se tenha estoques padronizados com títulos ótimos, comportamento da replicação em diferentes modelos celulares, cinética de replicação nos modelos celulares ótimos, além de um método de quantificação eficiente para a obtenção do título do vírus. Como todos os pontos dependem do resultado final, ou seja, da obtenção do título do vírus, primeiramente avaliamos as melhores condições para quantificar partículas virais infecciosas de ZIKV por ensaio de placa, utilizando linhagem de células Vero como modelo. As células foram infectadas com diluições seriadas do vírus no momento que atingiram cerca de 70% de confluência, e posteriormente foram mantidas com diferentes concentrações de CMC durante 5 dias. Após fixação e coloração posteriores ao período de titulação, notamos placas claras arredondadas e bem definidas na situação em que as células foram cultivadas na concentração de CMC a 1,5%. Por outro lado, a titulação mantida com CMC a 1% apresentaram placas irregulares e heterogêneas, enquanto na concentração de 3% de CMC placas pequenas e pouco visíveis foram obtidas, dificultando a segurança dos cálculos (**Figura 7**). Embora tenhamos realizado ensaios interrompendo a infecção em diferentes dias (**dados não apresentados**) só obtivemos resultados significativos com 5 dias, especialmente na condição de CMC a 1,5%.

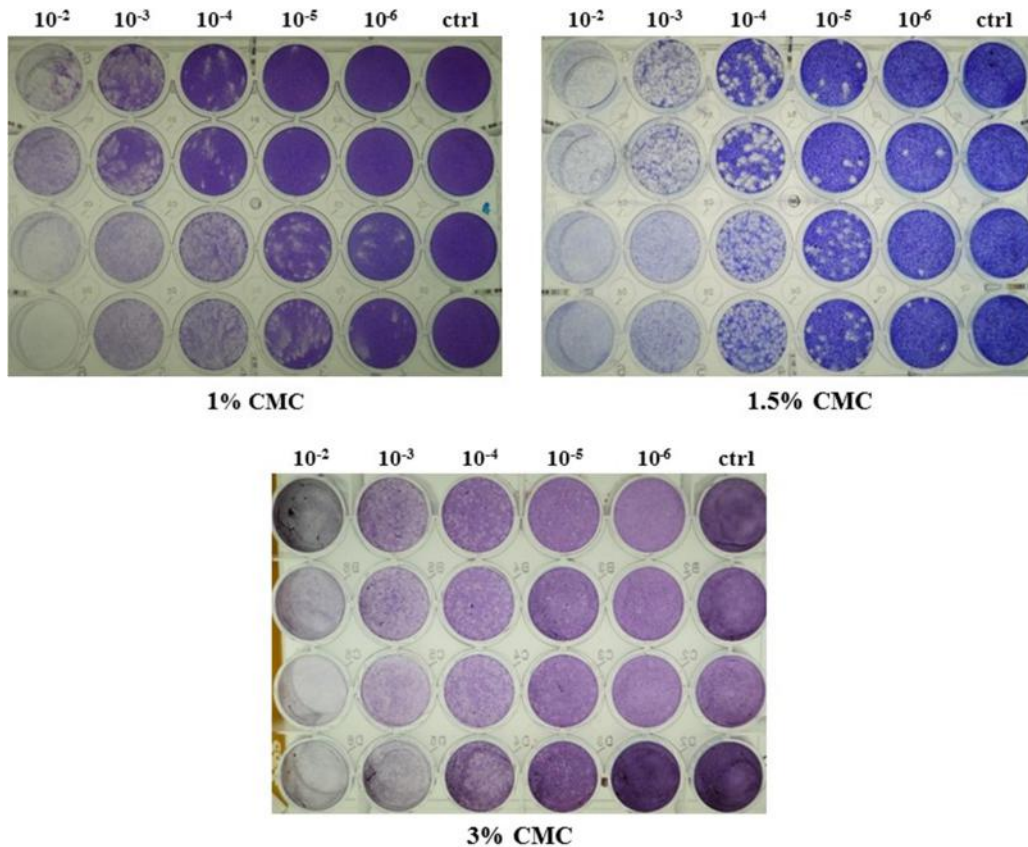


Figura 7: Padronização da titulação de ZIKV em células Vero. Vero foram plaqueadas, infectadas com diluições seriadas do estoque de ZIKV-BR^{PE} e cultivadas nas concentrações de 1%, 1,5% e 3% de CMC. Após 5 dias, as culturas foram fixadas com formaldeído e coradas com cristal violeta e as placas foram analisadas quantitativamente e qualitativamente. Figura representativa de n=3 experimentos realizados de forma independente.

5.2. Padronização da cinética de replicação de ZIKV-AFR e ZIKV-BR^{PE} em células C6/36 e Vero

Uma vez padronizada a titulação, prosseguimos com a determinação do melhor protocolo para propagação de ZIKV em linhagem celular de mamífero (Vero) e mosquito (C6/36). Para tal, utilizamos dois isolados de Zika: um correspondente a cepa africana MR766 (ZIKV-AFR) e uma cepa correspondente à linhagem asiática isolada em Pernambuco, Brasil (ZIKV-BR_{PE}). Para isso, células Vero foram infectadas com 3 diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) (0,1, 0,025, e 0,01) e os sobrenadantes foram coletados com 3 dias pós-infecção (d.p.i), quando detectamos cerca de 70% de CPE na cultura. A eficiência da replicação das diferentes cepas virais foi inversamente proporcional ao MOI. Além disso, ZIKV-AFR apresentou maiores taxas de replicação em Vero com títulos superiores a 10⁷ PFU/mL na situação de MOI 0,01 em comparação com ZIKV-BR^{PE} (**Figura 8A**).

Para a certificação de que a infecção chegou ao máximo de título em 3 d.p.i., as células foram infectadas no MOI ótimo (MOI 0,01) com ambas as cepas de ZIKV, os sobrenadantes foram coletados em três momentos diferentes da infecção: 2, 3 e 4 d.p.i e a morfologia celular conjuntamente ao aparecimento de efeito citopático (CPE) foram avaliados diariamente (**Figura 8B-C**). Detectamos grandes quantidades de partículas virais em apenas 2 d.p.i (quase 10^7 PFU/mL) e um máximo até 4 d.p.i. Os títulos do ZIKV-AFR decaíram em tempos superiores a 3 d.p.i quando as células já não pareciam mais viáveis na microscopia óptica (**Figuras 8B-C**). Em contraste com esses resultados, a cepa brasileira apresentou títulos elevados em 4 d.p.i, aparentando cinética de replicação mais lenta quando comparado ao ZIKV-AFR. Ainda, embora o CPE fosse visualizado com clareza na infecção por ZIKV-BR^{PE}, a camada de células aderidas permaneceu superior ao visto na infecção com ZIKV-AFR, cujo CPE resultando em células soltas foi mais intenso (**Figura 8C**).

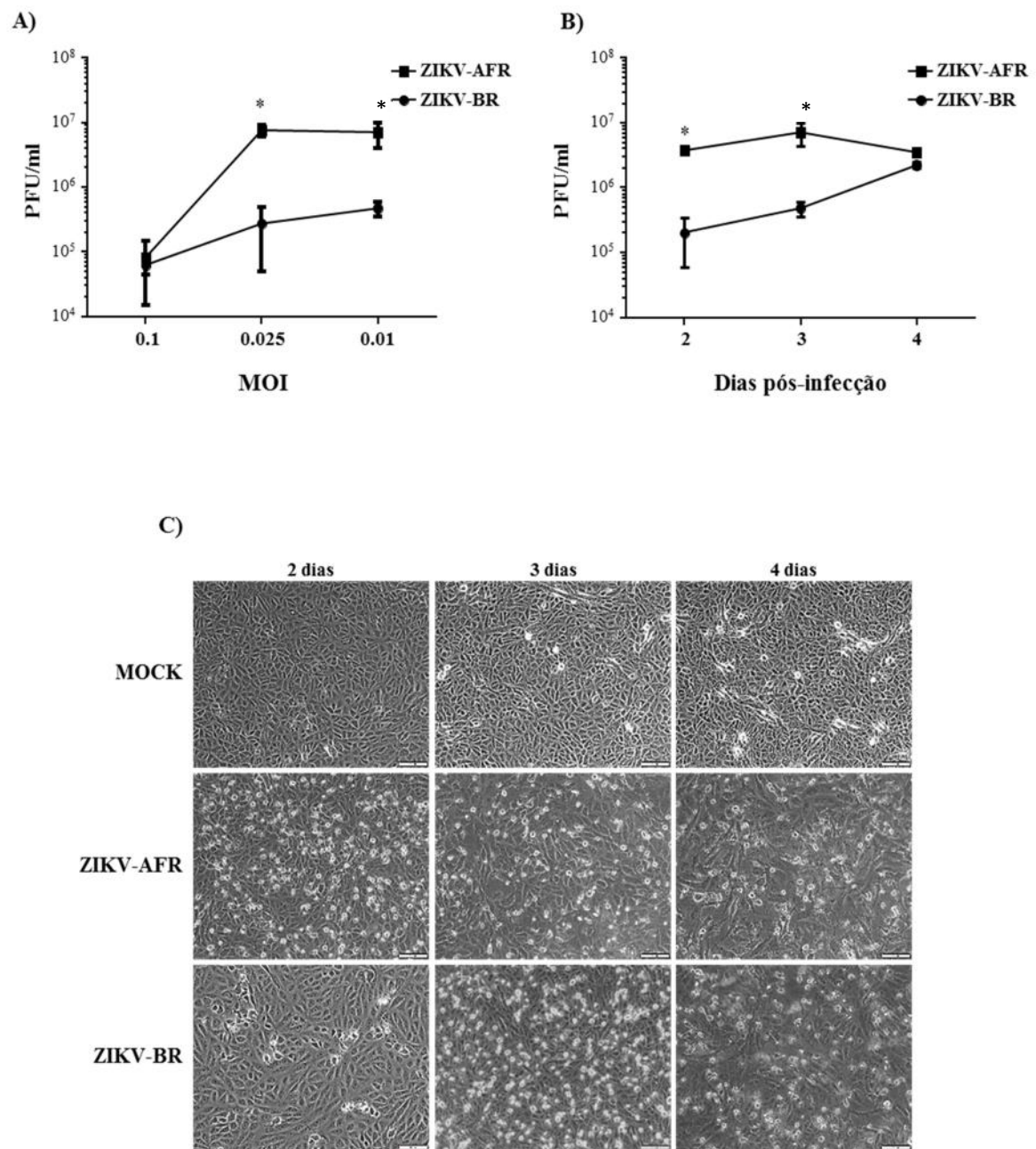


Figura 8: Cinética da replicação de ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-AFR em células Vero. ZIKV-BR^{PE} ou ZIKV-AFR foram inoculados com MOI de 0,1, 0,025 e 0,01. **(A)** A 3 d.p.i, os sobrenadantes foram recolhidos e titulados por ensaio de placa. **B-C)** ZIKV-BR^{PE} ou ZIKV-AFR foram inoculados com MOI de 0,01 em células Vero. Após três tempos distintos da infecção, os sobrenadantes foram recolhidos e titulados por ensaio de placa **(B)** e o CPE avaliado por microscopia óptica com objetiva de 10x representado em escala de 50 μ m **(C)**. Gráficos e imagens representativas da média \pm SD de 3 experimentos independentes. *P <0,05 em relação ao ZIKV-BR^{PE}.

Os mesmos ensaios foram realizados em células C6/36 recentemente descongeladas. Nessas células ambas as estirpes de ZIKV produziram altos níveis de partículas virais na MOI

de 0,01. Entretanto, ZIKV-BR_{PE} tendeu a replicar de forma mais eficiente neste tipo de célula comparado a estirpe de ZIKV-AFR (**Figura 9A**). A variação na produção de partículas infecciosas na linhagem de célula de mosquito não foi tão evidente quanto o que se observou nas células Vero para ambas as cepas virais. A velocidade comparada em ambos os tipos celulares mostrou através do acompanhamento do CPE que já com 3 d.p.i as células Vero apresentavam mais de 70% de destruição da monocamada enquanto que em células C6/36 esse efeito só foi detectado sutilmente em 7 d.p.i. A 10 d.p.i, apenas 20% de efeito citopático foi observado, mostrando que o vírus replica de forma mais lenta nesse tipo celular (**Figura 9C**). Sobrenadantes de células C6/36 infectadas com ZIKV-AFR ou ZIKV-BR_{PE} foram coletados com 4 a 10 d.p.i e os títulos de vírus foram analisados por ensaio de placa. A infecção com ZIKV-BR_{PE} resultou em títulos de vírus elevados já a 4 d.p.i, ainda que não tenha sido evidente a observação de CPE nesse tempo (**Figura 9B-C**). Em cada tempo de infecção 50% dos sobrenadantes foram recolhidos e a mesma quantidade de meio suplementado com SFB foi acrescentado para que os próximos tempos fossem coletados. Em todos os tempos subsequentes de infecção os títulos de vírus foram semelhantes para a cepa brasileira, indicando que estoques de ZIKV-BR^{PE} de alto título podem ser obtidos em células C6/36 recém-descongeladas já a 4 d.p.i, enquanto que ZIKV-AFR resultou em elevado título viral apenas a 7 d.p.i (**Figura 9B**).

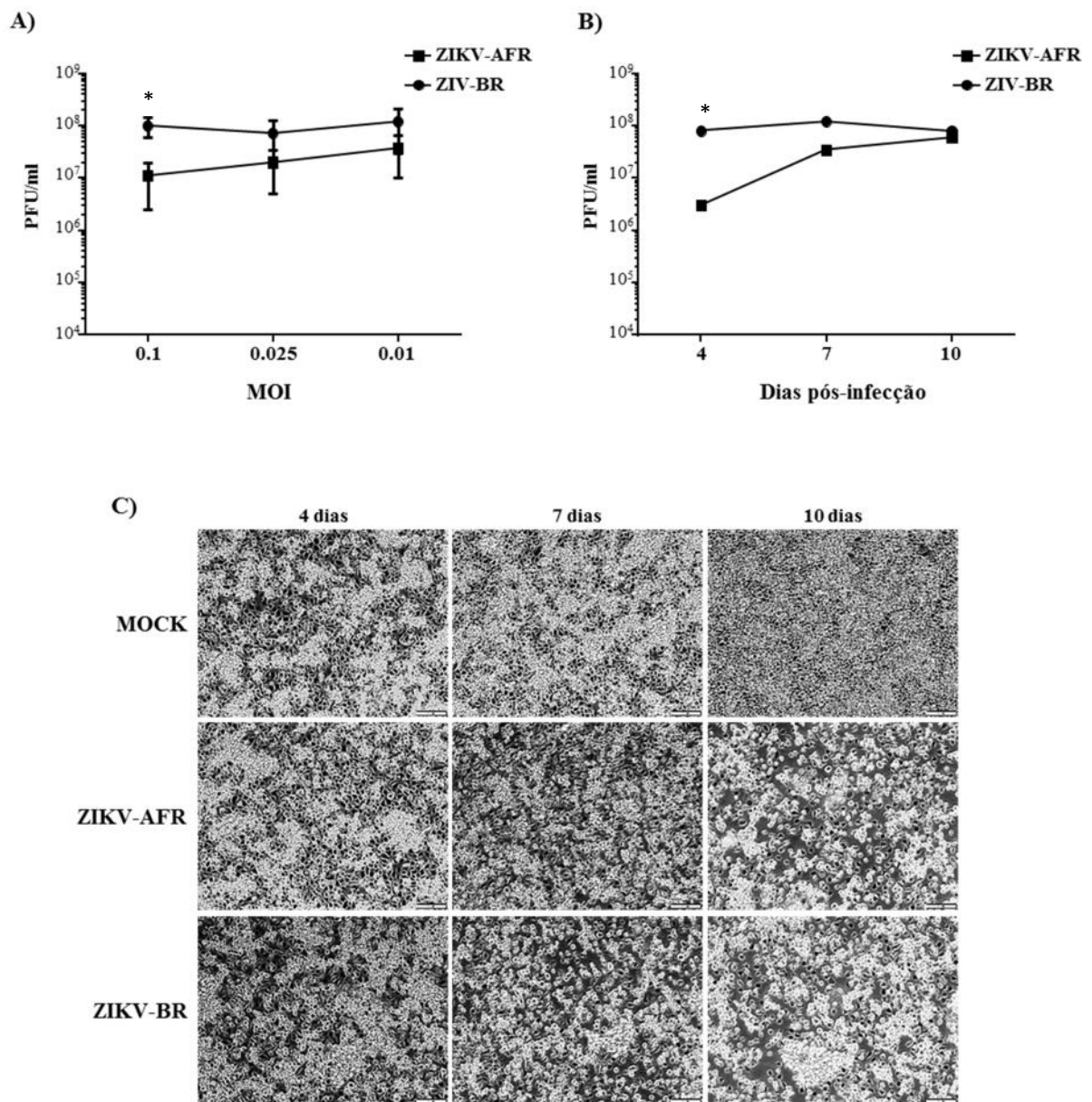


Figura 9: Cinética da replicação de ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-AFR em células C6/36. ZIKV-BR^{PE} ou ZIKV-AFR foram inoculados com MOI de 0,1, 0,025 e 0,01. (A) A 7 d.p.i, os sobrenadantes foram recolhidos e titulados por ensaio de placa. B-C) ZIKV-BR^{PE} ou ZIKV-AFR foram inoculados com MOI de 0,01 em células C6/36. Após três tempos distintos da infecção, os sobrenadantes foram recolhidos e titulados por ensaio de placa (B) e o CPE avaliado por microscopia óptica com objetiva de 10x e representado em escala de 50 μ m (C). Gráficos e imagens representativas da média \pm SD de 3 experimentos independentes. *P < 0,05 em relação ao ZIKV-AFR.

Todos estes dados em conjunto indicam que ambas as linhagens celulares são eficientes para a propagação do vírus, resultando em alto título viral, aproximadamente 10^7 PFU/ml, quando foi utilizada uma multiplicidade de infecção de 0,01. Além disso, ZIKV-AFR parece replicar melhor em células Vero, enquanto ZIKV-BR^{PE} foi mais eficiente em

células C6/36. Desta forma podemos estabelecer tempos distintos de coleta dos sobrenadantes para ambos os tipos celulares levando em conta a cepa de ZIKV utilizada, a fim de obter elevado título viral em tempo chave da infecção. No intuito de investigar se essas diferenças estavam relacionadas especificamente ao isolado de vírus, comparamos dois isolados ZIKV brasileiros ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-BR^{SP}. Os resultados foram semelhantes para ambos no que se refere ao MOI inicial e à cinética de replicação nas células C6/36 e Vero (**Figuras 10A-D**). Em seguida, foi estabelecida uma correlação entre a produção de partículas infecciosas de ZIKV e a detecção do genoma do vírus utilizando, respectivamente, o ensaio de placa e qRT-PCR. Sobrenadantes de células infectadas com ZIKV-BR^{PE} foram utilizadas para realizar uma curva de titulação do vírus de 10 a 10^6 PFU, e submetidos a uma PCR quantitativa em tempo real. A correlação entre os números PFU e CT é apresentada na Figura 10E, evidenciando uma relação de aproximadamente 3 CTs para cada um log do título do vírus (**Figura 10E**).

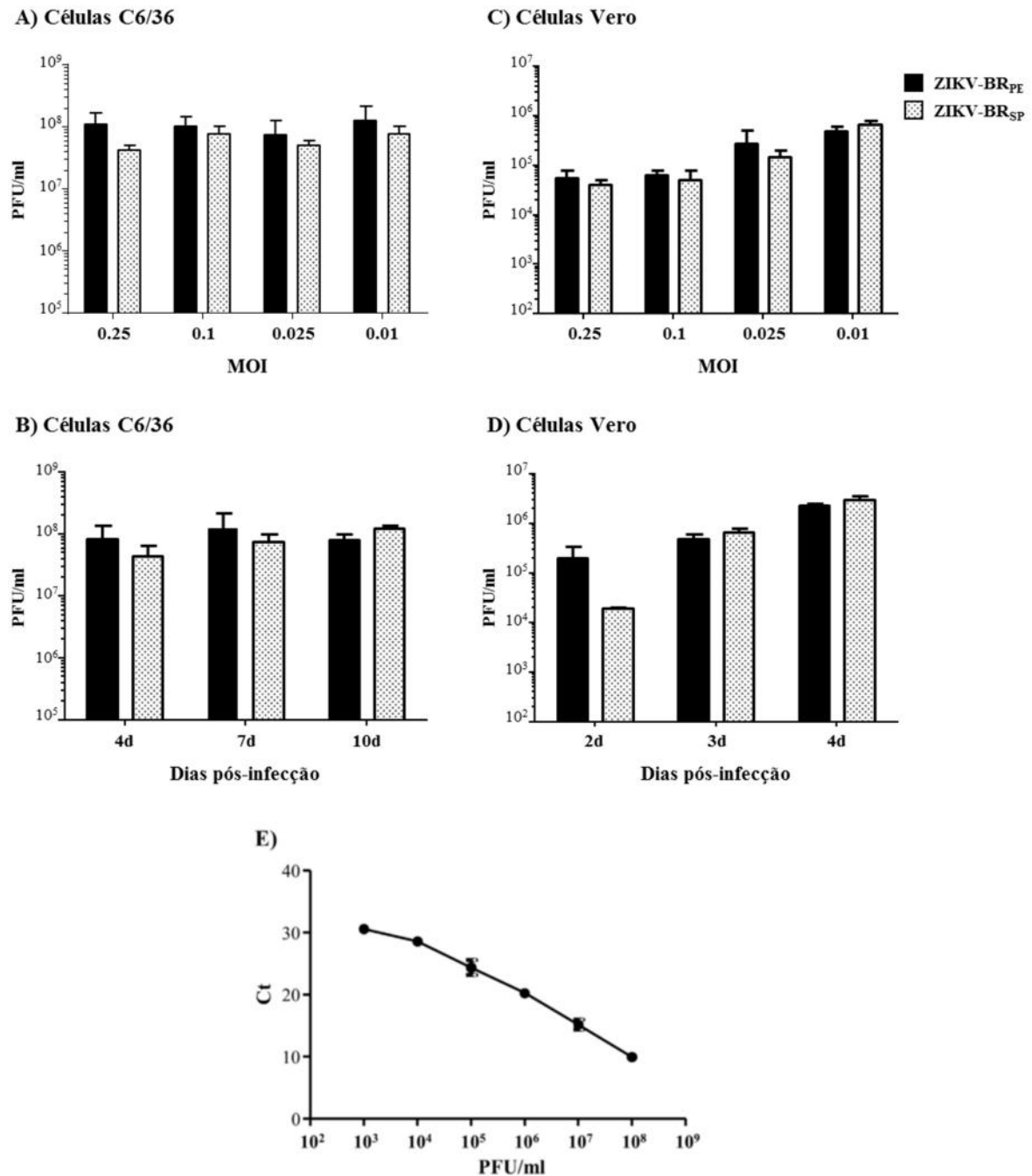


Figura 10: Comportamento de ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-BR^{SP} em C6/36 e Vero. A-B) ZIKV-BR^{PE} ou ZIKV-BR^{SP} foram inoculadas nas MOI indicadas em células C6/36 (A) ou Vero (B). Após 7 dpi, os sobrenadantes foram colhidos e a replicação viral foi avaliada por ensaio de placa. C-D) ZIKV-BR^{PE} ou ZIKV-BR^{SP} foram inoculados com MOIs 0,01 em células C6/36 (C) ou Vero (D). Após os pontos de tempo indicados p.i., os sobrenadantes foram titulados por ensaio de placa. E) Correlação entre a produção de partículas virais infecciosas tituladas por ensaio de placa e os valores de CT obtidos por qRT-PCR do sobrenadante de células C6/36 infectadas com ZIKV-BR^{PE}. Gráficos representativos da média ± SD de 3 experimentos independentes.

5.3. Suscetibilidade e permissividade de diferentes linhagens celulares à replicação ZIKV

Após o estudo da replicação de ZIKV em linhagens celulares de mosquito e macaco já bastante utilizadas para a propagação de outros flavivírus, analisamos a susceptibilidade e permissividade de diferentes tipos celulares, obtidos de diferentes tecidos e espécies hospedeiras, à infecção por ZIKV-BR^{PE}. Realizamos um screening avaliando linhagens celulares de origem humana (A549, HBMEC, U87, HeLa), primatas (LLC-MK2), rato (C6) e hamster (BHK-21). Para comparar a eficiência de replicação entre as linhagens celulares, normalizamos o protocolo de infecção utilizando MOI 0,1 e recolhendo os sobrenadantes a 3 d.p.i. Nos casos em que não pudemos observar qualquer evidência de CPE neste momento, as células foram mantidas por períodos mais longos. Uma vez que essas células podem ser cultivadas em diferentes concentrações para se conseguir a confluência e podem mostrar uma proliferação e uma cinética de sobrevivência distinta nas suas condições de cultura específicas, calculou-se a razão PFU/célula, considerando o número inicial de células no momento da infecção. Em relação às linhagens de células de mamífero testadas, as células endoteliais microvasculares do epitélio pulmonar humano (A549) e da microvasculatura de cérebro humano (HBMEC) apresentaram a maior eficiência de replicação, atingindo uma razão superior a 1 PFU/célula. No entanto, nenhuma delas atingiu a produção de descendência da linhagem de células de invertebrados C6/36 (16 PFU/célula), que aumentou ainda mais para 468 PFU/célula a 7 d.p.i. Todas as outras linhagens celulares testadas, incluindo as células derivadas de tumores cerebrais, foram fracamente permissivas para a replicação do vírus, apresentando rendimentos de progénies muito baixos em comparação com as células A549, HBMEC, C6/36 e Vero (**Tabela 1**).

Tabela 1. Suscetibilidade e permissividade de diferentes linhagens celulares à replicação ZIKV

Linhagem celular	Tipo celular/órgão	Hospedeiro	PFU/mL	PFU/célula
C6/36	Larva/glândula	Aedes albopictus	5×10^6	16 (464,7 ^a)
HBMEC	Endotelial/cérebro	Humano	$4,5 \times 10^5$	3,6
A549	Epitelial/pulmão	Humano	$8,45 \times 10^5$	1,14
Vero	Epitelial/Rim	Macaco verde africano	$2,2 \times 10^5$	0,33
LLCMK-2^b	Epitelial/rim	Macaca Mulata	$2,5 \times 10^3$	0,0125
BHK-21	Fibroblasto/rim	Hamster	$1,15 \times 10^2$	0,00034
U87	Glia/cérebro	Humano	$6,25 \times 10$	0,0000806
C6	Glia/cérebro	Rato	$4,75 \times 10$	0,000067
HeLa	Epitelial/Cérvix	Humano	$2,75 \times 10$	0,000042

5.4. Susceptibilidade de linhagens de camundongos imunocompetentes e imunodeficientes a infecção por ZIKV

Inicialmente, nós testamos a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos a infecção por ZIKV. Para isso, fêmeas de 8-10 semanas foram infectadas por via intravenosa (i.v.) com a cepa ZIKV-BR^{PE} (5×10^7 PFU) em E12.5 e sacrificadas em E18.5 (6d.p.i) (**Figura 11A**). A infecção sistêmica foi confirmada pela presença de vírus no baço de todos os animais, e a disseminação para o SNC foi avaliada pela análise da carga viral no cérebro. Corroborando com dados da literatura, nós observamos que camundongos C57BL/6 apresentaram menor carga viral no baço e cérebro em relação outras linhagens avaliadas. Camundongos A129 apresentaram maior carga viral em ambos os órgãos e essa diferença foi especialmente notada no cérebro, confirmando a maior susceptibilidade dessa linhagem imunodeficiente a infecção e disseminação viral para o SNC (**Figura 11B**).

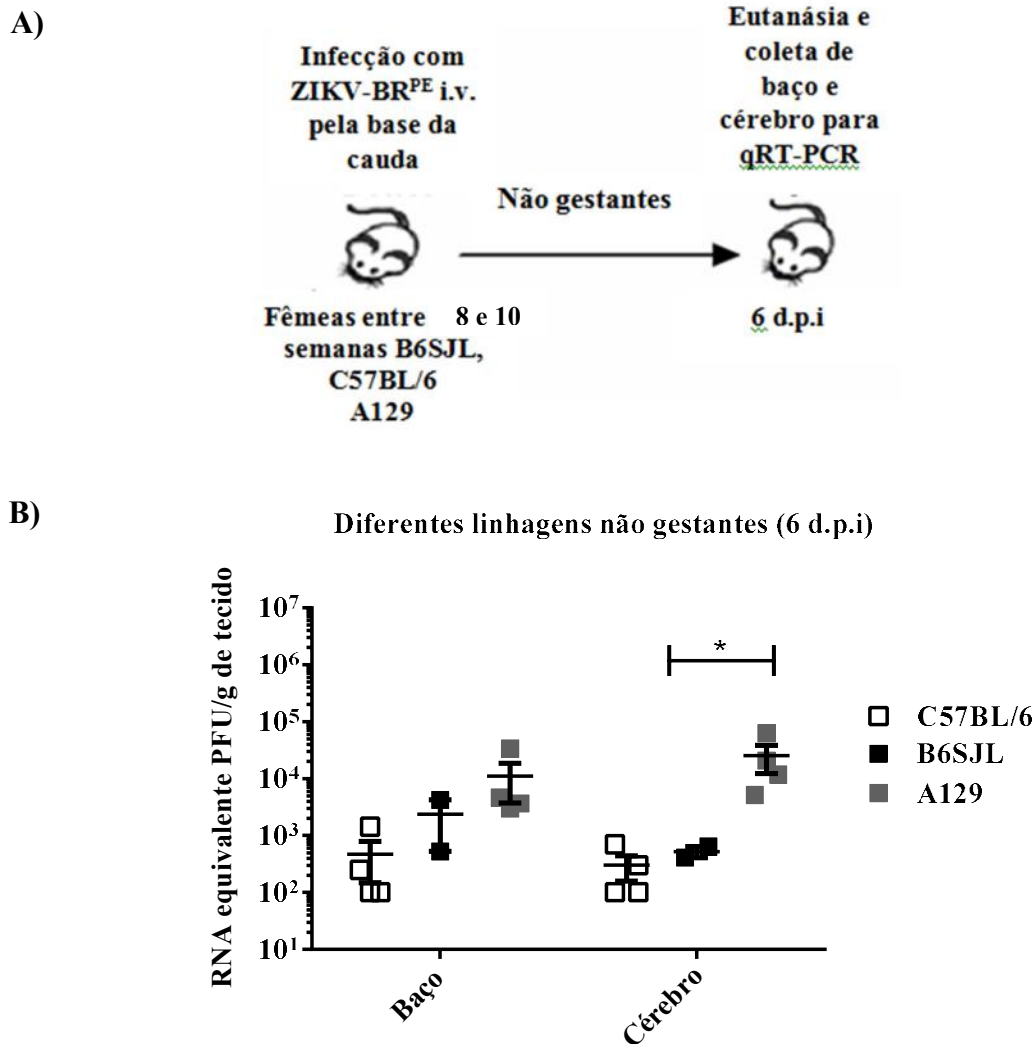


Figura 11. Susceptibilidade da infecção por ZIKV em diferentes linhagens de camundongos. A) Esquema da infecção. B) Camundongos fêmeas imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL ou imunodeficientes A129 foram infectados com a cepa ZIKV-BR^{PE}. Após 6 d.p.i os animais foram sacrificados e seus tecidos como baço e cérebros recolhidos para a detecção de RNA viral por qRT-PCR. Gráficos representativos da média \pm SD dos animais. *P < 0,05 C57BL/6 em relação ao A129.

5.5. Susceptibilidade à infecção por ZIKV em diferentes linhagens de camundongos gestantes

Uma vez avaliada a susceptibilidade de camundongos de diferentes linhagens à infecção por ZIKV, decidimos investigar como estes mesmos animais, agora gestantes, responderiam à infecção. Para isso, fêmeas gestantes das linhagens C57BL/6, B6SJL ou A129 foram infectadas sistemicamente i.v. pela base da cauda no período embrionário (E) 12.5 com ZIKV-BR^{PE} (5×10^7 PFU) e eutanaziados em dois tempos distintos: 15.5 e 18.5 (referente a 3

d.p.i e 6 d.p.i, respectivamente) (**Figura 12A**). No momento da eutanásia, os órgãos foram recolhidos para a análise da presença de RNA viral por qRT-PCR e após 4h ou 48h posterior à infecção, o sangue foi coletado para avaliar a presença de partículas infecciosas (viremia) por ensaio de plaque em células Vero. Não detectamos viremia em nenhuma das linhagens imunocompetentes nos tempos de infecção analisados (**dados não apresentados**). Animais C57BL/6 eutanaziados no período 15.5 apresentaram presença de RNA viral no cérebro, baço, e feto em níveis maiores do que aqueles detectados em 18.5 (**Figura 12B**). Por outro lado, especificamente as placentas desses animais sacrificados 18.5 apresentaram maior carga viral quando comparado ao animal sacrificado em 15.5. Embora se tenha detectado RNA viral em tecidos como placenta e feto, não houve alteração da prole no que se refere ao peso e tamanho, bem como na medida desses animais (**dados não apresentados**). Esses dados demonstram que, embora a infecção de camundongos C57BL/6 não esteja associada a sinais clínicos em adultos ou fetos, o ZIKV está presente nos tecidos, incluindo no tecido placentário, ainda que em baixos níveis, até o final da gestação. Nota-se, no entanto, que a carga viral na placenta e no feto diminui ao longo do tempo, mas é ainda detectável em 18.5. Esses achados sugerem que a presença de partículas virais, isoladamente, talvez não seja o único mecanismo associado à transmissão fetal e lesão tecidual. Comparando-se a carga viral de camundongos C57BL/6 gestantes e não gestantes, nas mesmas condições de infecção, nós observamos maiores concentrações de RNA viral no baço e cérebro de gestantes em 18.5 (**Figura 14A**), sugerindo que gestantes podem ser mais susceptíveis à infecção por ZIKV, provavelmente pela diferença no perfil inflamatório da condição de gestação, a qual precisa ainda ser investigada.

Semelhantemente, animais B6SJL infectados e sacrificados em 15.5 apresentaram carga viral significativamente maior quando comparado ao grupo sacrificado em 18.5, particularmente na placenta e feto. Esses animais infectados obtiveram redução do número de filhotes, embora peso e medida tenham permanecido inalterados (**dados não apresentados**). Além disso, a carga viral no baço e cérebro de gestantes foi também maior do que em não gestantes (**Figura 14B**). Esses dados sugerem que, tal como observado na linhagem C57BL/6 gestantes B6SJL são mais susceptíveis do que não gestantes. No entanto, a carga viral reduz ao longo tempo, sugerindo uma capacidade de controle da replicação viral, ainda que parcial, nesse período de tempo.

Diferentemente dos outros modelos, a infecção de camundongos *Ifnar1^{-/-}* A129 com 5×10^7 PFU resultou em prejuízo na prole como redução no número de fetos e fetos malformados, além de pontos de aborto e reabsorções na placenta. Devido a esses eventos,

não foi possível realizar as análises de carga viral utilizando esse inóculo. Ainda assim, a avaliação da carga viral em baço e cérebro das gestantes está em andamento e será importante para compararmos a susceptibilidade e disseminação entre gestantes e não gestantes (**Figura 14C**). Realizamos, então, os experimentos com concentrações mais baixas de inóculo viral. Camundongos A129 infectados com ZIKV-BR^{PE} (10^3 PFU) apresentaram elevada carga viral em todos os tecidos avaliados (**Figura 12D**). Os níveis de RNA em baço e cérebro foram semelhantes aqueles detectados em não gestantes infectadas com inóculo 4 vezes superior nesse período de tempo (E18.5), demonstrando a maior susceptibilidade de gestantes também nesse modelo animal. Além disso, mesmo com doses mais baixas de inóculo, altos níveis de RNA viral foram detectados na placenta e feto. A avaliação da carga viral em diferentes períodos de tempo ainda não foi realizada e será importante para determinar se o nível de RNA viral nos diferentes tecidos se mantém, ao contrário do observado em linhagens de camundongos imunocompetentes.

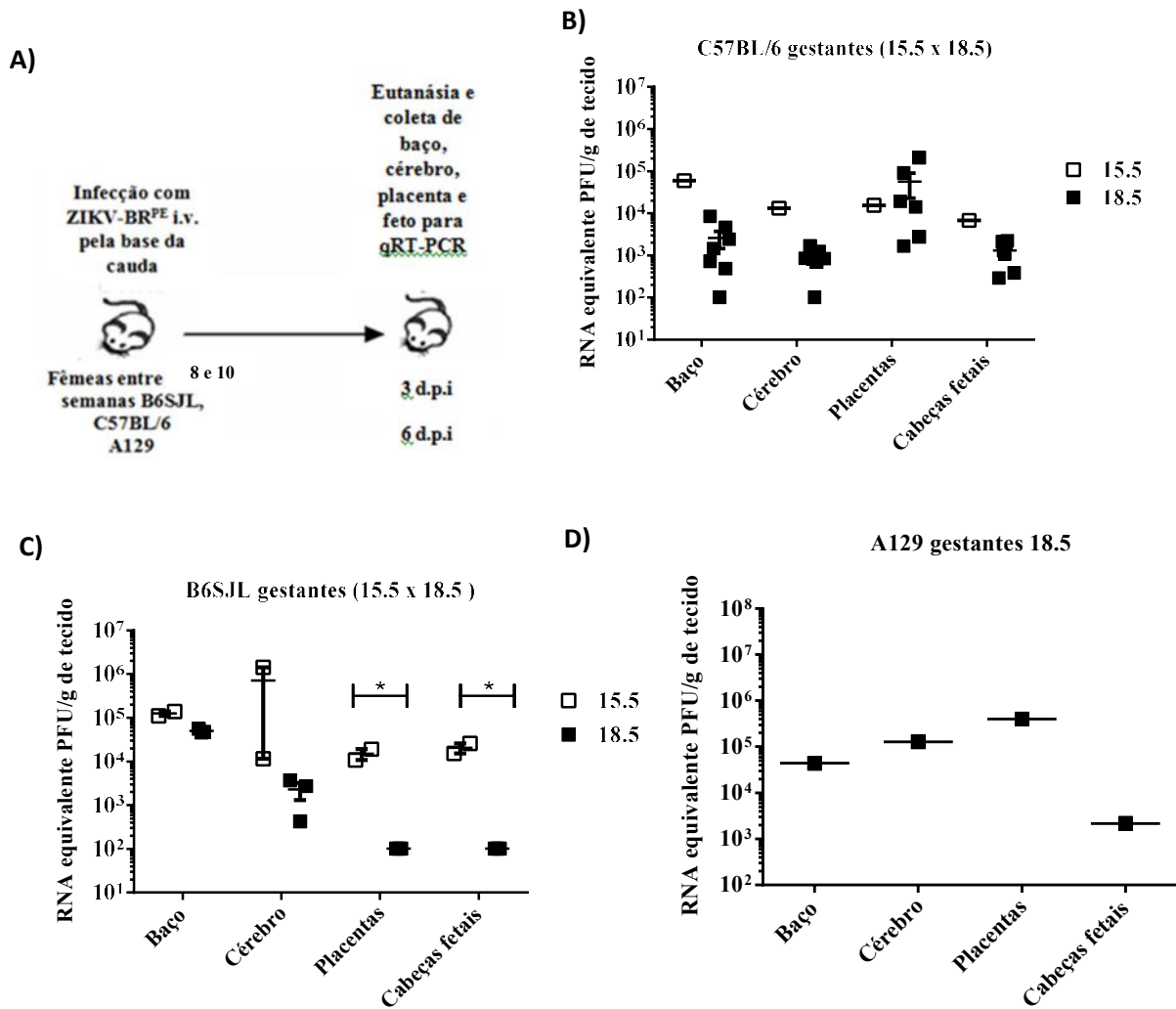
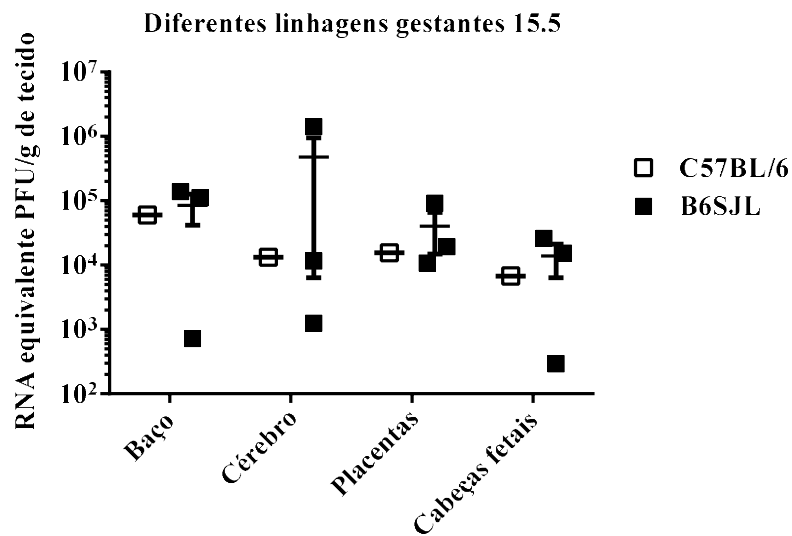


Figura 12. Infecção de ZIKV em linhagens de camundongos gestantes. A) Esquema da infecção. B) Animais imunocompetentes C57BL/6, C) B6SJL ou D) imunodeficientes A129 foram infectados com ZIKV no período E12.5. Em 15.5 e 18.5 os animais foram eutanaziados e seus tecidos foram coletados para a detecção de carga viral nos tecidos e no feto por qRT-PCR. Gráficos representativos da média \pm SD dos animais. *P < 0,05 B6SJL 15.5 em relação a B6SJL 18.5.

Comparando as diferentes linhagens de camundongos gestantes quanto ao tempo de infecção, notamos que em E15.5 a carga viral nos diferentes tecidos foi semelhante nos camundongos C57BL/6 e SJL, nos quais a infecção não gerou prejuízo na prole; no entanto a carga viral em A129 ainda precisa ser avaliada (**Figura 13A**). A avaliação da carga viral em E18.5 demonstrou, claramente, maiores níveis de RNA viral nos camundongos A129 no cérebro em relação as outras linhagens avaliadas. Comparando-se a carga viral entre camundongos C57BL/6 e A129, observa-se que, embora a carga viral no baço e cérebro sejam maiores em A129, os níveis de RNA na placenta e feto foram semelhantes, sugerindo a capacidade de disseminação viral e transmissão vertical de ZIKV mesmo em camundongos

imunocompetentes, embora essa transmissão não tenha resultado em prejuízo da prole (**Figura 13B**). Interessantemente também observamos que níveis semelhantes de RNA foram encontrados no baço em SJL e A129, no entanto, a carga viral em cérebro, placenta e feto foi bem maior nos animais A129, sugerindo que, nesse caso, a capacidade de disseminação viral pode ser relevante para indução de alterações congênitas (**Figura 13B**). Vale ressaltar que o número de animais avaliados ainda foi pequeno e precisa ser aumentado para confirmação dessas conclusões. Além disso, a titulação da carga de partículas infecciosas nos diferentes tecidos também precisa ser analisada.

A)



B)

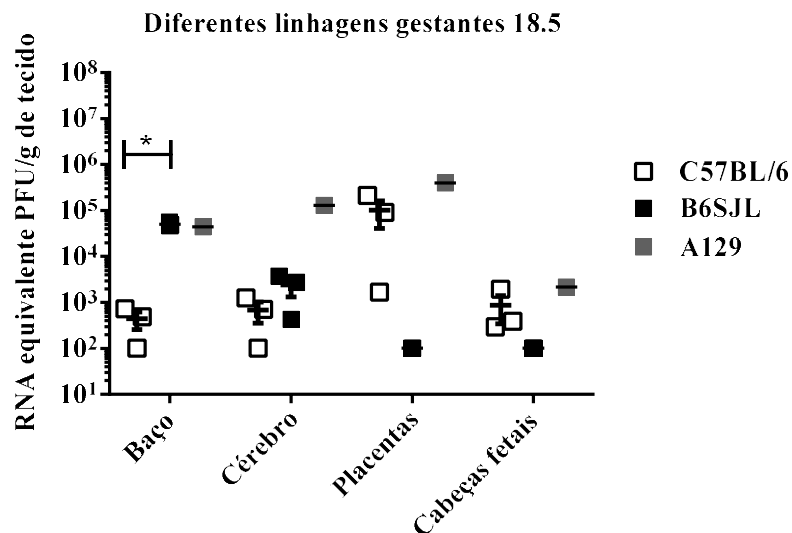
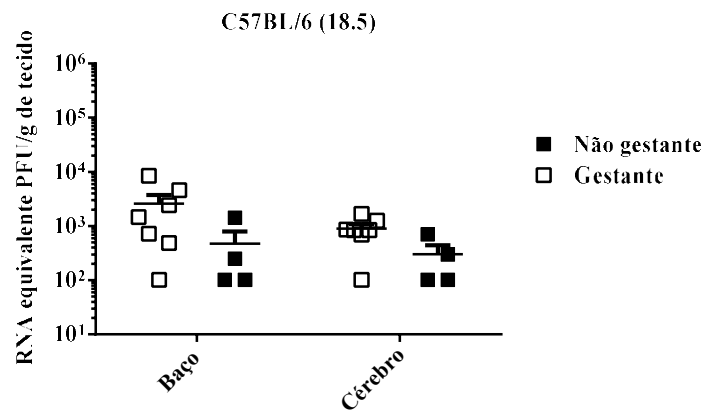


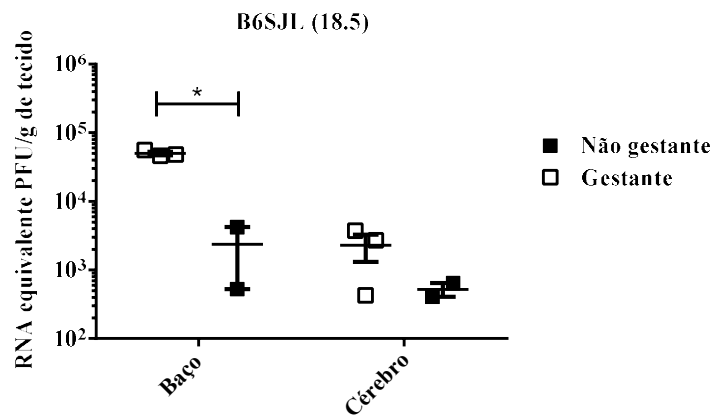
Figura 13. Comparação das linhagens gestantes frente ao tempo de infecção. Animais imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL ou imunodeficientes A129 foram infectados com ZIKV no período E12.5. No período 15.5 e

18.5 os animais foram eutanaziados e seus tecidos foram coletados para a detecção de carga viral nos tecidos e no feto por qRT-PCR. Em **A)** comparação das linhagens imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL15.5 e em **B)** comparação das linhagens imunocompetentes e imunodeficientes 18.5. Gráficos representativos da média \pm SD dos animais. * $P < 0,05$ B6SJL em relação ao C57BL/6.

A)



B)



C)

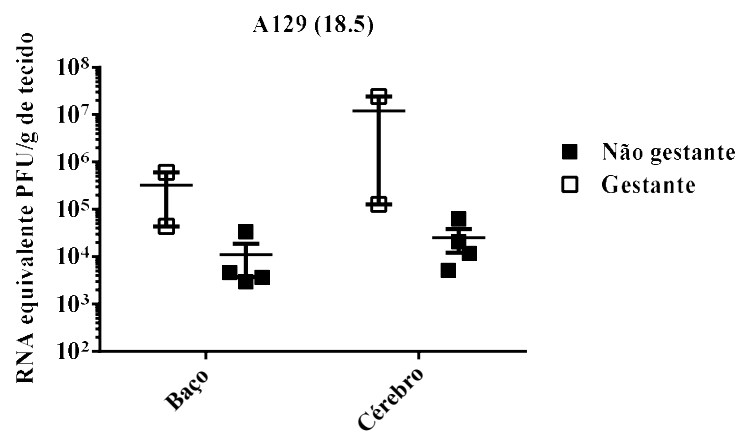


Figura 14. Comparação das linhagens de camundongos infectados por ZIKV frente a gestação. Animais imunocompetentes. **A)** C57BL/6 e **B)** B6SJL ou imunodeficientes **C)** A129 gestantes ou não foram infectados com ZIKV-BR^{PE}. Após 3 d.p.i e 6d p.i os animais foram eutanaziados e seus tecidos foram coletados para a detecção de carga viral nos tecidos e no feto por qRT-PCR. Gráficos representativos da média \pm SD dos animais. *P <0,05 baço B6SJL gestante em relação ao B6SJL não gestante.

Embora todos esses animais não sejam um modelo ideal para o estudo da infecção e da patogênese do vírus quando comparado à infecção em humanos, eles nos permitem inferir que a gestação por si só é capaz de contribuir para o maior avanço da infecção, provavelmente dificultando a resolução, o que pode ser evidenciado pelo tempo prolongado de permanência de RNA viral nos tecidos desses animais. Além disso, os dados com camundongos A129 sugerem um papel fundamental da resposta de IFN do tipo I para resolução da infecção e redução da disseminação na gestação.

5.6. Análise do perfil de citocinas da linhagem C57BL/6 frente à infecção durante a gestação

Uma vez observada a tendência da maior susceptibilidade à infecção por ZIKV durante a gestação, e tendo sido observado que apenas a presença de vírus não é determinante para alterações congênitas nos modelos experimentais murinos aqui investigados, decidimos avaliar algumas citocinas em tecidos específicos, tanto da linhagem C57BL/6 imunocompetente, quanto de animais A129, no intuito de relacionar essa tendência com o perfil inflamatório na placenta. Para isso, fêmeas gestantes e não gestantes C57BL/6 e A129 foram infectadas i.v. pela base da cauda, e no período 18.5 foram eutanasiadas. Órgãos como baços placenta e feto foram utilizados para as análises. Nós observamos que em animais C57BL/6, houve um aumento nos níveis esplênicos de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 quando comparado à mesma linhagem não gestante, sugerindo que respostas envolvendo esses mediadores podem ser importantes para uma eventual alteração congênita. Análise da expressão de citocinas na placenta demonstrou uma redução significativa de TNF- α , embora em níveis muito baixos. Assim, análise de um maior número de animais precisará ser realizada a fim de confirmar a relevância biológica do achado. Observamos, ainda, níveis diminuídos de IFN-g, IL-6 e IL-10 nos fetos, mas, da mesma forma, o número de animais avaliados ainda foi baixo e precisa ser aumentado para confirmar o achado. Embora as análises tenham sido tardias quando pensamos na produção e secreção dessas citocinas, esses dados sugerem que a modificação no perfil de citocinas induzido pela infecção, provavelmente relacionado com outros componentes do sistema imune, pode favorecer o sucesso do vírus e

dificuldades para a resolução da infecção na condição de gestação. A avaliação desse perfil em animais A129, e comparação com as outras linhagens murinas será fundamental para investigar se a resposta imune disparada pela infecção nos diferentes modelos de susceptibilidade, transmissão vertical e alteração congênita pode contribuir para esses eventos.

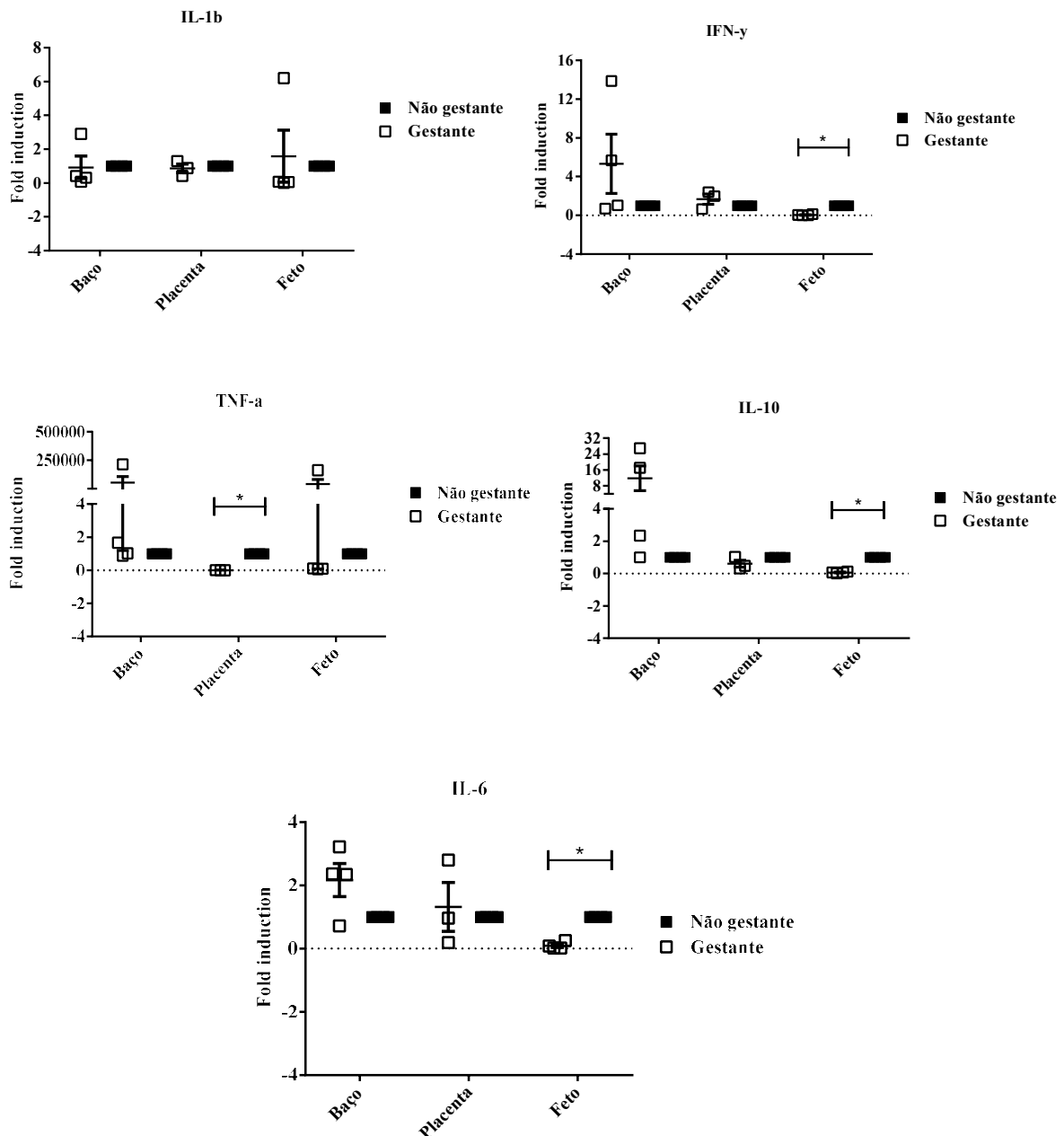


Figura 15. Análise do perfil de citocinas da linhagem C57BL/6 frente a infecção durante a gestação. Animais imunocompetentes C57BL/6 foram infectados com ZIKV-BR^{PE}. Em 18.5 os animais foram eutanaziados e seus tecidos foram coletados para a avaliação do perfil de citocinas nos tecidos como baço,

placenta e no feto por qRT-PCR. Gráficos representativos da média \pm SD dos animais.*P <0,05 foram considerados significativos.

6. DISCUSSÃO

Desde o final do ano de 2015, o Brasil tem enfrentado um grande desafio em decorrência do aumento da circulação de ZIKV no país. Transmissões autóctones do vírus foram relatadas massivamente ao longo de todo o período, sendo associadas principalmente à picada de vetores artrópodes.

A rápida propagação do vírus para vários outros países americanos (FARIA *et al.*, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2015), bem como a característica aguda dos surtos e os graves efeitos neurológicos da infecção, fizeram com que a nova arbovirose se tornasse rapidamente emergência em saúde pública (WHO, 2016). Esse alerta obrigou a comunidade científica a investir em investigações no estudo de vários aspectos da biologia do vírus para o desenvolvimento de vacina e terapias contra a infecção. Nesse contexto, muitos grupos de pesquisa fora do campo do estudo de flavivírus envolveram em investigações para compreender as diversas manifestações causadas pelo ZIKV e acelerar as pesquisas. Isso levou a necessidade de superar vários obstáculos, como a obtenção de um protocolo padronizado para propagação e quantificação do vírus, a fim de, por exemplo, superar a produção de estoques virais de baixo título, uma característica bem conhecida dos flavivirus (MARAMOROSCH & MCINTOSH, 1994).

Neste presente trabalho, determinamos um protocolo de rotina para propagar, titular e purificar ZIKV *in vitro*, usando linhagens celulares de mosquitos e mamíferos, bem como buscamos investigar e padronizar a infecção em modelos *in vivo* de camundongos gestantes e não gestantes. Desta forma, grupos de pesquisas que trabalham ou não com ZIKV ou outros flavivirus podem obter o básico e essencial nessas padronizações para o adiantamento de suas pesquisas.

Inicialmente, determinamos as linhagens celulares e condições de infecção adequadas para a obtenção de títulos virais ótimos de forma reprodutível. Para isso, testamos e estabelecemos a melhor célula, MOI e cinética de replicação de ZIKV de linhagens africanas e asiáticas. A cepa de ZIKV-AFR usado neste estudo foi o protótipo de isolamento africano MR766, originalmente propagado em células Vero (WAY *et al.*, 1976), enquanto que o ZIKV-BR^{PE} corresponde a um isolado da cepa asiática associada ao surto recente do vírus e aos casos de sinais neurológicos em recém nascidos e adultos. De fato, ZIKV-AFR foi mais bem propagada em células Vero, com a produção de mais de 10^7 PFU/ml em apenas 2 d.p.i. Por outro lado, os dois isolados brasileiros pertencentes à linhagem asiática analisadas neste estudo replicaram melhor nas células de mosquito C6/36, embora ZIKV-AFR também tenha replicado de forma eficiente nesse tipo celular.

Um estudo da cinética de replicação das diferentes cepas, tanto em C6/36 quanto em células Vero, permitiu inferir que, uma infecção de 4 dias em células Vero e 7 dias em células C6/36, utilizando MOI de 0,01, proporcionam títulos similares para ambas as cepas de ZIKV. Aqui nós também demonstramos que através do controle do tempo de infecção é possível se obter vírus com títulos semelhantes provenientes da mesma linhagem celular. Isso é importante para estudos que desejam, por exemplo, comparar as diferenças das cepas do vírus, principalmente no que se refere à aquisição do envelope proveniente do brotamento da célula hospedeira. Interessantemente, trabalhos já haviam sugerido que células C6/36 e Vero podem ser importantes para a amplificação de carga viral de espécimes clínicos, embora não tenha havido investigações posteriores (DENG *et al.*, 2016)

Paralelamente a nossa padronização um protocolo mais simples foi publicado. Entretanto, diferentemente do nosso trabalho, o grupo descreveu apenas uma condição de propagação e titulação, sem comparar diferentes células, diferentes MOIs, ou mesmo diferentes cepas do vírus, além de não discutir a respeito da purificação (AGBULOS *et al.*, 2016).

Embora tenhamos estabelecido multiplicidade de infecção e tempos específicos para a obtenção de bons títulos de vírus em ambas as células utilizando diferentes cepas de ZIKV, notamos que títulos elevados de ZIKV-BR^{PE} foram observados já com 4 d.p.i, e até 10 d.p.i esse título ainda permanecia consideravelmente alto. Mesmo não tendo observado tempos posteriores a 10 d.p.i, devido às condições da célula, sugerimos que tempos posteriores a esse não são mais adequados para o crescimento do vírus. Por outro lado, essa mesma cepa em células Vero apresentou crescimento de até um logaritmo a cada dia de infecção. Até 4 d.p.i observamos que o vírus continuava sendo produzido por essa linhagem celular. Mesmo não acompanhando tempos posteriores a 4 d.p.i, acreditamos que em células Vero para a cepa de ZIKV-BR^{PE} é possível obter títulos maiores em até pelo menos 5 d.p.i.

Comparando diferentes multiplicidades de infecção para as diferentes cepas em ambas as linhagens celulares, observamos que maiores títulos foram obtidos com os menores MOI (0,025 e 0,01). Apesar de estabelecermos o MOI de 0,01 como ótimo, observamos resultados semelhantes utilizando o MOI de 0,025. Diferentemente em células Vero, todos os quatro MOI utilizados em células C6/36 apresentaram altos títulos de vírus, embora houvesse pequenas diferenças entre eles.

No que se refere ao efeito citopático acompanhado ao longo dos dias de infecção por microscopia óptica, é importante notar que ZIKV não induziu um CPE notável em células C6/36, e obtivemos altos rendimentos de vírus mesmo quando a morfologia celular e a adesão

da monocamada foram semelhantes aos controles experimentais (“MOCK”). Em até 10 d.p.i, observamos que cerca de 70-80% da monocamada de células ainda permanecia aderida. Além disso, descobrimos que a infecção em C6/36 produziu rendimentos mais altos quando as células foram usadas recentemente após descongeladas. Nesse aspecto ainda permanecemos em investigação, mas acreditamos que o metabolismo da célula no momento do descongelamento parece favorecer a infecção por ZIKV. Temos notado que substâncias utilizadas para o congelamento das células, especialmente o dimetilsulfóxido (DMSO), pode estar favorecendo a infecção, como já demonstrado para algumas hepatites (SAINZ, FRANCIS & CHISARI, 2006; HUANG *et al.*, 2012)

O CPE induzido por vírus também foi difundido quando as células Vero foram infectadas com ZIKV-AFR ou ZIKV-BR^{PE}. Para a última cepa, as células permaneceram aderidas durante um período mais longo, embora apresentasse uma morfologia mais redonda. Quando comparamos os CPE de células C6/36 e Vero, observamos que a destruição da monocamada pela infecção viral pareceu ser muito mais intensa em células Vero, claramente visível quando acompanhadas pela microscopia óptica. Esses detalhes sutis também podem ajudar os pesquisadores a analisar se o tipo de célula é ou não adequado para a propagação do vírus.

Uma vez estabelecido os pontos como MOI e tempo de infecção, nos perguntamos se estes se reproduziam para diferentes isolados do vírus. Notamos pela comparação de dois isolados asiáticos ZIKV-BR^{PE} e ZIKV-BR^{SP} que os mesmos resultados poderiam ser obtidos para ambos, utilizando as duas mesmas linhagens celulares e as mesmas condições aplicadas na comparação entre as cepas.

Importantemente, avaliamos a replicação de ZIKV em algumas linhagens celulares, de diferentes tecidos e espécies hospedeiras, e detectamos dois tipos de células humanas - HBMEC e A549 - que produziram altos títulos de vírus após a infecção. Essas células foram mais permissivas do que células Vero, porém não mais que células C6/36. Apesar desses dados, optamos por não utilizar essas linhagens para obtenção de estoques virais devido ao fato de que células Vero e C6/36 são de fácil manipulação e já são amplamente utilizadas em diferentes laboratórios de pesquisa em virologia, para a propagação de outros flavivírus como o vírus da dengue (DENV) ou outros vírus. Portanto, a padronização da propagação viral nessas últimas pode ser mais amplamente utilizada por outros grupos.

Curiosamente, a replicação do vírus em células derivadas de tumores cerebrais de origem humana ou de rato produziu títulos insignificantes em comparação às outras linhagens. ZIKV-AFR replicou melhor em células de primatas (com exceção de células LL-MCK2) do

que a cepa brasileira, provavelmente refletindo a adaptação prévia do vírus a células de primatas não humanos.

Ainda dentro da padronização de um protocolo *in vitro*, procedemos com a purificação de ZIKV. Esse processo foi estabelecido por sedimentação através de um gradiente de sacarose com uma eficiência de recuperação de vírus superior a 65%, eficiência essa calculada através da relação do título do input inicial e do total de PFU obtido das frações purificadas. A recuperação do ZIKV purificado foi confirmada por eletroforese em gel de SDS-acrilamida, microscopia eletrônica e titulação de todas as frações (superior, inferior, mediana e purificada). Os altos rendimentos e a pureza do vírus purificado são essenciais para estudos sobre a estrutura do vírus, interação do mesmo com os componentes celulares e diversos estudos realizados *in vivo*.

Um estudo prévio descreveu um método para a purificação de ZIKV (Polinésia Francesa H/PF/2013) utilizando uma centrifugação de colchão de sacarose seguida por um gradiente contínuo de tartarato de potássio (SIROHI *et al.*, 2016). Este método também permitiu o alto rendimento de ZIKV purificado, mas exigiu o uso de uma linhagem de células Vero que super expressasse a protease furina, diferente da linhagem celular usada no presente trabalho, C6/36, que é rotineiramente usada por vários grupos. Além disso, conseguimos obter frações de vírus enriquecidas usando menos células C6/36, do que Vero, uma vez que as células de mosquito produzem o maior rendimento de vírus infeccioso extracelular entre todas as linhagens celulares testadas quando inferimos a quantidade de PFU produzido por cada célula.

Uma vez estabelecido os protocolos *in vitro*, partimos para compreender e tentar estabelecer um modelo *in vivo* imunocompetente e imunodeficiente de camundongos gestantes e não gestantes. Nós observamos que dentre as linhagens não gestantes testadas, a imunodeficiente A129 foi a mais susceptível à infecção, seguida das linhagens imunocompetentes B6SJL e C57BL/6, respectivamente. De fato, muitos trabalhos utilizando modelos animais tem mostrado a susceptibilidade de A129 à infecção por ZIKV (ROSSI *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016). Isso tem sido necessário, uma vez visto que o vírus, diferentemente de células humanas, não é capaz de escapar da resposta antiviral de modelos murinos imunocompetentes. Em células humanas, o vírus evade a resposta de IFN I através da degradação de Stat2 (GRANT *et al.*, 2016). Adicionalmente, animais Stat2^{-/-} são altamente susceptíveis à infecção, tanto para a cepa africana, quanto para a cepa asiática do vírus em diferentes intensidades (TRIPATHI *et al.*, 2017). Nossos dados corroboram com a literatura, mostrando que animais A129 infectados com a cepa asiática do

vírus apresentam elevadas cargas virais em tecidos como cérebro e placenta. Por outro lado, a linhagem imunocompetente C57BL/6 é levemente infectada, e a via de inoculação diferente da intracerebral resulta em baixa morbidade desses animais (PARDY *et al.*, 2017). Da mesma forma se comportam animais das linhagens BalbC e CD-1 (LAROCCA *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016). De fato, nossos dados mostram que a linhagem C57BL/6 foi a menos susceptível à infecção por ZIKV, com carga viral mais baixa em tecidos como baço e cérebro.

Embora muitas linhagens sejam consideradas imunocompetentes, sabe-se que elas se comportam de maneira diferente frente às infecções, principalmente por apresentarem diferenças intrínsecas no perfil imunológico. Animais SJL, por exemplo, são mais susceptíveis à encefalomielite experimental e aumento da incidência de linfoma de Hodgkin, além de apresentarem determinados subconjuntos de células T (SPINDLER *et al.*, 2001; MATSUSHIMA & STOHLMAN, 1991). Em nosso trabalho, utilizamos uma linhagem cruzada de C57BL/6 e SJL, denominada B6SJL. Nós observamos que dentre as três linhagens testadas, a B6SJL foi a segunda mais susceptível à infecção por ZIKV, apresentando carga viral em tecidos como baço e cérebro.

Já é descrito que o estado imunológico durante o período de gestação sofre alterações, e esse evento pode fazer com que a gestação potencialize inúmeras infecções virais, como a infecção por ZIKV (KING *et al.*, 2017). Tendo em vista as grandes marcas neurológicas observadas durante a gestação através da infecção por ZIKV, nós decidimos, então, utilizar modelos das mesmas linhagens antes testadas, agora gestantes, para avaliar os efeitos da infecção no perfil inflamatório sistêmico e correlacionar este com o perfil inflamatório na placenta. Para isso, comparamos linhagens gestantes e não gestantes de camundongos imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL, e imunodeficiente A129. Nós observamos que gestantes tenderam a ser mais susceptíveis à infecção por ZIKV, quando comparado à mesma linhagem não gestante. Todas as linhagens gestantes apresentaram carga viral maior em tecidos como cérebro, placenta, e nos fetos.

Ainda que a literatura seja bastante limitada nesse aspecto de comparação de gestantes e não gestantes em modelo animal, já foi visto que fêmeas gestantes imunocompetentes C57BL/6 e SJL ou imunocomprometidas como A129 são extremamente importantes para o estudo de infecção congênita (CUGOLA *et al.*, 2016; MORRISON & DIAMOND, 2017). Camundongos gestantes C57BL/6 ou SJL com idade entre 6 e 8 semanas inoculados com ZIKV apresentaram restrição de crescimento intra-uterino de fetos e estabelecimento de sinais de microcefalia (CUGOLA *et al.*, 2016). Em nossos experimentos utilizamos fêmeas de 8 a

10 semanas. A infecção no período 12.5 de gestação (doze dias após a confirmação da gravidez) com sacrifício em dois períodos distintos, 15.5 (3 d.p.i) e 18.5 (6 d.p.i), não mostrou diferenças nos pesos e nem no tamanho dos fetos para as linhagens imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL, até o momento do interrupimento da gestação. No entanto, carga viral foi detectada em tecidos como baço, cérebro, placenta e até mesmo no feto, principalmente nos grupos 15.5. As diferenças observadas podem se dever ao tempo de infecção e cepa viral utilizada, destacando a importância da padronização desses protocolos para comparação entre os achados entre diferentes análises e diferentes grupos de pesquisa.

Outro trabalho tem mostrado que fêmeas C57BL/6 e A129 inoculadas por via subcutânea no dia embrionário 6.5 (E6.5) ou E7.5, apresentam RNA viral na placenta e no cérebro de fetos (MINER *et al.*, 2016). Embora nossa infecção tenha sido em um período mais tardio da gestação (E 12.5), e a via de inoculação tenha sido a intravenosa pela base da cauda, nossos dados corroboram com a literatura. No caso dos animais A129, nós observamos que gestantes inoculadas com doses superiores a 10^3 PFU da cepa asiática do vírus geram enormes danos à prole, o que dificulta as análises nesse grupo. Por isso, especificamente para essa linhagem imunocomprometida, estabelecemos um inóculo de 10^3 PFU, enquanto que para as linhagens imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL, estabelecemos uma dose de 5×10^7 PFU.

A comparação entre grupos 15.5 e 18.5 da mesma linhagem, mostrou que gestantes eutanasiadas 3 d.p.i apresentam maior carga viral em todos os órgãos analisados. Essa carga tende a diminuir no período 18.5, mas ainda é possível detectar RNA viral. Apesar de percebermos a redução da carga viral nos tecidos do período 15.5 para o 18.5, quando comparamos gestantes e não gestantes infectadas, notamos que gestantes possuem maior dificuldade na resolução da infecção. Novamente, imaginamos que o perfil inflamatório da gestação poderia estar favorecendo a infecção, ou dificultando a resolução da mesma.

Animais C57BL/6-IFNAR KO infectados com ZIKV por via intracerebral são marcados por infiltrados de neutrófilos, macrófagos e aumento de IL-1, IL-6, e a mesma linhagem imunocompetente apresentam infiltrados de células T CD8⁺ e aumento da expressão de IFN- γ (MANANGEESWARAN, IRELAND&VERTHELYI, 2016). Nós investigamos o padrão de algumas citocinas em gestantes infectadas, comparando com a mesma linhagem murina gestante não infectada. Nós observamos em animais C57BL/6, uma diminuição significativa em fetos de IFN- γ , IL-10 e IL-6, e uma tendência na diminuição de IL-1 β e TNF- α comparado a gestantes não infectadas. Em tecidos como placenta, foi observado um aumento significativo de TNF- α e uma tendência no aumento de IFN- γ ,

enquanto que no baço houve uma tendência no aumento de IL-10 e IL-6. Essa modificação no perfil de citocinas, principalmente quando olhamos para feto e placenta, pode estar relacionada com os sinais da infecção pelo vírus. Dados do grupo demonstraram que a infecção de explantes placentários *ex vivo* induziu um aumento de expressão de IL-1b, IL6, IL-10 e TNF-a, demonstrando que a infecção viral nesse tecido pode influenciar diretamente o perfil inflamatório (Ribeiro, et al., submetido para publicação). A avaliação desse perfil em camundongos A129 e comparação com outras linhagens será fundamental para compreendermos melhor esses eventos e está em andamento. Além disso, uma vez que detectamos RNA viral nos fetos mesmo nos modelos onde não houve prejuízo da prole ou alteração congênita detectável ao nascimento, pretendemos investigar mais detalhadamente a resposta nos fetos, analisando não só o perfil de expressão de citocinas, mas também o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T, a presença de anticorpos específicos e neutralizantes e a capacidade de resposta de linfócitos T *ex vivo*.

Assim como já discutido em outros trabalhos, é importante ressaltar que a interação entre vários componentes da imunidade do hospedeiro pode estar relacionada ou com o controle, ou com o sucesso da infecção. Desta forma, por mais que tenhamos analisado o comportamento de algumas citocinas importantes, a interação entre a imunidade inata e adaptativa é essencial para compreender a patogênese da infecção pelo ZIKV (PARDY *et al.*, 2017; WINKLER *et al.*, 2017).

Em resumo, desenvolvemos protocolos detalhados que podem ajudar pesquisadores de diversas áreas de especialização para estudar a biologia e a patogênese do ZIKV. Nosso estudo pode contribuir para estabelecer novas redes ZIKV em todo o mundo para controlar essa infecção.

7. CONCLUSÕES

- A concentração de 1,5% de CMC e 5 dias de titulação por ensaio de plaque em células Vero foi ideal para a quantificação dos PFU de ZIKV, enquanto que outras células e outros tempos de infecção não apresentaram resultados satisfatórios;
- Linhagens celulares de glândula de mosquito C6/36 endotélio humano HBMEC, eptélio pulmonar A549 e epitélio renal de macaco Vero são altamente permissivas a infecção por ZIKV;
- O protocolo estabelecido de 3 d.p.i em células Vero e 7 d.p.i em células C6/36, MOI de 0,01, para ambas as cepas de ZIKV, foram ideais para a obtenção de títulos ótimos de vírus;
- É possível obter títulos elevados em ambas às células controlando o período de infecção com as duas cepas de ZIKV;
- A obtenção de títulos elevados de vírus purificado pode ser adquirida após o processo de purificação utilizando gradiente de sacarose;
- Camundongos imunocompetentes C57BL/6 e B6SJL, e imunodeficientes A129, podem ser sistemicamente infectados por ZIKV;
- A linhagem A129 é mais susceptível à infecção seguido pelas linhagens imunocompetentes B6SJL e C57BL/6, respectivamente;
- Gestantes das mesmas linhagens são mais susceptíveis à infecção quando comparado aos grupos não gestantes, sendo maior carga viral detectada principalmente no período 15.5 (3 d.p.i). Até 18.5 (6 d.p.i) foi possível detectar vírus em tecidos da mãe e no feto;
- Análise do perfil de citocinas em tecidos específicos mostrou diminuição de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 em fetos e diminuição de TNF- α na placenta, podendo este perfil estar relacionado com os eventos observados de menor resistência à infecção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abushouk, A.I., Negida, A., Ahmed, H. (2016). An updated review of Zika virus. *J Clin Virol*, 84,53-58.
- Agbulos, D. S., Barelli, L., Giordano, B. V., & Hunter, F. F. (2016). Zika Virus: Quantification, Propagation, Detection, and Storage. *Current protocols in microbiology*, 15D-4.
- Amraoui, F., Atyame-Nten, C., Vega-Rúa, A., Lourenço-De-Oliveira, R., Vazeille, M., & Failloux, A. B. (2016). *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Eurosurveillance*, 21(35). Araujo, A.Q., Silva, M.T., Araujo, A.P. (2016). Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain*, 139(Pt 8),2122-30.
- Barjas-Castro, M.L., Angerami, R.N., Cunha, M.S., Suzuki, A., Nogueira, J.S., Rocco, I.M., Maeda, A.Y., Vasami, F.G., Katz, G., Boin, I.F., Stucchi, R.S., Resende, M.R., Esposito, D.L., de Souza, R.P., da Fonseca, B.A., Addas-Carvalho, M. (2016). Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*, 56,1684-8.
- Barr, K.L., Anderson, B.D., Prakoso, D., Long, M.T. (2016). Working with Zika and Usutu Viruses In Vitro. *PLoS Negl Trop Dis*, 10,e0004931.
- Barreto-Vieira, D.F., Barth, O.M., Silva, M.A., Santos, C.C., Santos Ada, S., F JB Filho, Filippis, A.M. (2016). Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111,532-4.
- Barzon, L., Trevisan, M., Sinigaglia, A., Lavezzo, E., Palù, G. (2016). Zika virus: from pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiol Lett*, 363,fnw202.
- Bearcroft, W.G. (1956). Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 50,442-8.
- Berthet, N., Nakouné, E., Kamgang, B., Selekon, B., Descorps-Declère, S., Gessain, A., & Kazanji, M. (2014). Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(12), 862-865.
- Brasil, P., Pereira, J.P. Jr., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.A., Salles, T.S., Zin, A.A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira P.,Pilotto, J.H., Medialdea-Carrera, R., Cotrim da Cunha, D., Abreu de Carvalho L.M., Pone, M., Machado Siqueira, A., Calvet, G.A., Rodrigues Baião, A.E., Neves, E.S., Nassar de Carvalho, P.R., Hasue, R.H., Marschik, P.B., Einspieler, C., Janzen, C., Cherry, J.D., Bispo de Filippis, A.M., Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*, 375,2321-2334.
- Calvet, G., Aguiar, R.S., Melo, A.S., Sampaio, S.A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E.S., de Sequeira, P.C., de Mendonça, M.C., de Oliveira, L., Tschoeke, D.A., Schrago, C.G., Thompson, F.L., Brasil, P., Dos Santos, F.B., Nogueira, R.M., Tanuri, A., de Filippis, A.M. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*, 16,653-60.
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1885.
- Cao-Lormeau, V.M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S.K., Willison, H.J., Musset, L., Manuguerra, J.C., Despres, P., Fournier, E., Mallet, H.P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J., Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 387,1531-9.
- Cao-Lormeau, V.M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.L., Mallet, H.P., Sall, A.A., Musso, D. (2014). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*, 20,1085-6.
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., Cleret de Langavant, L., de Broucker, T., Brun-Buisson, C., Leparac-Goffart, I., Mekontso Dessap, A. (2016). Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N Engl J Med*, 374,1595-6.

- Casals, J. (1961). Procedures for identification of arthropod-borne viruses. *Bull World Health Organ*, 24,723–734.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med*, 3,866–871.
- Chibueze, E.C., Parsons, A.J.Q., Lopes, K.D.S., Yo, T., Swa, T., Nagata, C., Horita, N., Morisaki, N., Balogun, O.O., Dagvadorj, A., Ota, E., Mori, R., Oladapo, O.T. (2017). Diagnostic Accuracy of Ultrasound Scanning for Prenatal Microcephaly in the context of Zika Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*, 7,2310.
- Cordeiro, M. T., Pena, L. J., Brito, C. A., Gil, L. H., Marques, E. T., et al. (2016). Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet*, 387,1811–1812.
- Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Russo, F.B., Freitas, B.C., Dias, J.L., Guimarães, K.P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G.C., Romero, S., Polonio, C.M., Cunha, I., Freitas, C.L., Brandão, W.N., Rossato, C., Andrade, D.G., Faria, D de P., Garcez, A.T., Buchpigel, C.A., Braconi, C.T., Mendes, E., Sall, A.A., Zanotto, P.M., Peron, J.P., Muotri, A.R., Beltrão-Braga, P.C. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534,267-71.
- Dahlgren, L., Wilson, R.D. (2001). Prenatally diagnosed microcephaly: a review of etiologies. *Fetal Diagn Ther*, 16,323-6.
- Davidson, A., Slavinski, S., Komoto, K., Rakeman, J., Weiss, D. (2016). Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65,716-7.
- De Oliveira, W.K. (2015). ZIKAVÍRUS–INFORMAÇÃO SOBRE DOENÇA E INVESTIGAÇÃO DE SÍNDROME EXANTEMÁTICA NO NORDESTE. Coordenação Geral de Vigilância e Resposta às Emergências de Saúde Pública, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, 11 de maio de 2015.
- Deng, C., Liu, S., Zhang, Q., Xu, M., Zhang, H., Gu, D., Shi, L., He, J., Xiao, G., Zhang, B. (2016). Isolation and characterization of Zika virus imported to China using C6/36 mosquito cells. *Virol Sin*, 31, 176-9.
- Dick, G.W., Kitchen, S.F., Haddow, A.J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R Soc Trop Med and Hyg*, 46, 509-520.
- Donald, C.L., Brennan, B., Cumberworth, S.L., Rezelj, V.V., Clark, J.J., Cordeiro, M.T., Freitas de Oliveira França, R., Pena, L.J., Wilkie, G.S., Da Silva Filipe, A., Davis, C., Hughes, J., Varjak, M., Selinger, M., Zuvanov, L., Owsianka, A.M., Patel, A.H., McLauchlan, J., Lindenbach, B.D., Fall, G., Sall, A.A., Biek, R., Rehwinkel, J., Schnettler, E., Kohl, A. (2016). Full Genome Sequence and sRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 10,e0005048.
- D'Ortenzio, E., Matheron, S., Yazdanpanah, Y., de Lamballerie, X., Hubert, B., Piorkowski, G., Maquart, M., Descamps, D., Damond, F., Leparac-Goffart, I. (2016). Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med*, 374,2195-8.
- Duffy, M.R., Chen, T.H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, 360,2536-43.
- El Costa, H., Gouilly, J., Mansuy, J. M., Chen, Q., Levy, C., Cartron, G., et al. (2016). ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci. Rep.* 6, 35296.
- Faria, N. R., da Silva Azevedo, R. D. S., Kraemer, M. U., Souza, R., Cunha, M. S., Hill, S. C., ... & Rocco, I. M. (2016). Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*, 352(6283), 345-349.
- Faria, N.R., Azevedo, R do S., Kraemer, M.U., Souza, R., Cunha, M.S., Hill, S.C., Thézé, J., Bonsall, M.B., Bowden, T.A., Rissanen, I., Rocco, I.M., Nogueira, J.S., Maeda, A.Y., Vasami, F.G., Macedo, F.L., Suzuki, A., Rodrigues, S.G., Cruz, A.C., Nunes, B.T., Medeiros, D.B., Rodrigues, D.S., Nunes Queiroz, A.L., da Silva, E.V., Henriques, D.F., Travassos da Rosa, E.S., de Oliveira, C.S., Martins, L.C., Vasconcelos, H.B., Casseb, L.M., Simith, D de B., Messina, J.P., Abade, L., Lourenço, J., Carlos Junior Alcantara, L., de Lima, M.M., Giovanetti, M., Hay, S.I., de Oliveira, R.S., Lemos, P da S., de Oliveira, L.F., de Lima, C.P., da Silva, S.P., de Vasconcelos, J.M., Franco, L., Cardoso, J.F., Vianez-Júnior, J.L., Mir, D., Bello, G., Delatorre,

- E., Khan, K., Creatore, M., Coelho, G.E., de Oliveira, W.K., Tesh, R., Pybus, O.G., Nunes, M.R., Vasconcelos, P.F. (2016). Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, 352,345-9.
- Faye, O., Freire, C. C., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., & Zanotto, P. M. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2636.
- Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*. 5th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken.
- Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., Missé, D., Gadea, G., Viranaicken, W., Desprès, P. (2016). The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology*, 493,217-26.
- Garcez, P.P., Loiola, E.C., Madeiro da Costa, R., Higa, L.M., Trindade, P., Delvecchio, R., Nascimento, J.M., Brindeiro, R., Tanuri, A., Rehen, S.K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, 352,816-8.
- Goo, L., VanBlargan, L. A., Dowd, K. A., Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2017). A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006178.
- Gourinat, A.C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., Dupont-Rouzeyro, M. (2015). Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis*, 21,84–86.
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., ...& García-Sastre, A. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell host & microbe*, 19(6), 882-890.
- Guo, X.X., Li, C.X., Deng, Y.Q., Xing, D., Liu, Q.M., Wu, Q., Sun, A.J., Dong, Y.D., Cao, W.C., Qin, C.F., Zhao, T.Y. (2016). *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect*, 5,e102.
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., ... & Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1477.
- Haddow, A.J., Williams, M.C., Woodall, J.P., Simpson, D.I., Goma, L.K. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (stegomyia) africanus* (theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ*, 31, 57-69.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*, 89,8880-96.
- Hanners, N.W., Eitson, J.L., Usui, N., Richardson, R.B., Wexler, E.M., Konopka, G., Schoggins, J.W. (2016). Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. *Cell Rep*, 15,2315-22.
- Harrison, S.C. (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 15,690-8.
- Heymann, D.L., Hodgson, A., Sall, A.A., Freedman, D.O., Staples, J.E., Althabe, F., Baruah, K., Mahmud, G., Kandun, N., Vasconcelos, P.F., Bino, S., Menon, K.U. (2016). Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet*, 387,719-21.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F.A., Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol*, 189,223-32.
- <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-zika>

- Huang, H. C., Chen, C. C., Chang, W. C., Tao, M. H., & Huang, C. (2012). Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *Journal of virology*, 86(17), 9443-9453.
- King, N.J.C., Teixeira, M.M., Mahalingam, S. (2017). Zika Virus: Mechanisms of Infection During Pregnancy. *Trends in Microbiology*, Month Year, Vol. xx, No. yy
- Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J., Stanfield, S.M., Duffy, M.R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*, 14,1232-9.
- Larocca, R.A., Abbink, P., Peron, J.P., Zanutto, P.M., Iampietro, M.J., Badamchi-Zadeh, A., Boyd, M., Ng'ang'a, D., Kirilova, M., Nityanandam, R., Mercado, N.B., Li, Z., Moseley, E.T., Bricault, C.A., Borducchi, E.N., Giglio, P.B., Jetton, D., Neubauer, G., Nkolola, J.P., Maxfield, L.F., De La Barrera, R.A., Jarman, R.G., Eckels, K.H., Michael, N.L., Thomas, S.J., Barouch, D.H. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, 536,474-8.
- Lazear, H.M., Govero, J., Smith, A.M., Platt, D.J., Fernandez, E., Miner, J.J., Diamond, M.S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe*, 19,720-30.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol*, 11,688-700.
- Liu, S., DeLalio, L. J., Isakson, B. E., & Wang, T. T. (2016). AXL-mediated productive infection of human endothelial cells by Zika virus. *Circulation research*, CIRCRESAHA-116.
- Liu, S., DeLalio, L.J., Isakson, B.E., Wang, T.T.(2016). AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ Res*, 119,1183-1189.
- Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X. & Helenius, A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76, 5480-5491.
- Lucchese, G., Kanduc, D. (2016). Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. *Autoimmun Rev*, 15,801-8.
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K., & Westaway, E. G. (1999). Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *Journal of virology*, 73(11), 9555-9567.
- Mackenzie, J.M., Westaway, E.G. (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol*, 75,10787-99.
- Macnamara, F.N (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 48, 139-45.
- Manangeeswaran, M., Ireland, D. D., & Verthelyi, D. (2016). Zika (PRVABC59) infection is associated with T cell infiltration and neurodegeneration in CNS of immunocompetent neonatal C57Bl/6 mice. *PLoS pathogens*, 12(11), e1006004.
- Maramorosch, K., & McIntosh, A. H. (1994). *Arthropod cell culture systems*. CRC Press.
- Marchette, N.J., Garcia, R., Rudnick, A (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*, 18, 411-5.
- Martina, B.E., Koraka, P., Osterhaus, A.D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*, 22,564-81.
- Martines, R.B., Bhatnagar, J., Ramos, A.M de O. et al. (2016). Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. 388, 898-904.

- Matsushima, G.K., Stohlman, S.A. (1991). Distinct subsets of accessory cells activate Thy-1+ triple negative (CD3-, CD4-, CD8-) cells and Th-1 delayed-type hypersensitivity effector T cells. *J Immunol*, 146,3322-31.
- Mecharles S., Herrmann C., Poullain P., Tran T. H., Deschamps N., Mathon G., Landais, A., Breurec, S., Lannuzel, A. (2016). Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet*, 387,1481.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., ... & Couplier, M. (2017). Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell reports*, 18(2), 324-333.
- Melo, A.S., Aguiar, R.S., Amorim, M.M., Arruda, M.B., Melo, F.O., Ribeiro, S.T., Batista, A.G., Ferreira, T., Dos Santos, M.P., Sampaio, V.V., Moura, S.R., Rabello, L.P., Gonzaga, C.E., Malinger, G., Ximenes, R., de Oliveira-Szejnfeld, P.S., Tovar-Moll, F., Chimelli, L., Silveira, P.P., Delvechio, R., Higa, L., Campanati, L., Nogueira, R.M., Filippis, A.M., Szejnfeld, J., Voloch, C.M., Ferreira, O.C. Jr., Brindeiro, R.M., Tanuri, A. (2016). Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurol*, 73,1407-1416.
- Millichap, J.G. (2016). Zika Virus Infection and Microcephaly. *Pediatr Neurol Briefs*. 30, 8.
- Miner, J.J., Diamond, M.S.(2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*, 21,134-142.
- Miner, J.J., Cao, B., Govero, J., Smith, A.M., Fernandez, E., Cabrera, O.H., Garber, C., Noll, M., Klein, R.S., Noguchi, K.K., Mysorekar, I.U., Diamond, M.S. (2016). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*, 165,1081-91.
- Ministério da Saúde. (2017). Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Volume 48 N° 6
- Ministério da Saúde. (2017). Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Volume 48 N° 29
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*, 374,951-8.
- Morrison, T.E., Diamond, M.S.(2017). Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. *J Virol*, 91,pii: e00009-17.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R., Rossmann, M (2005). A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle. *Nature Microbiology*. Indiana, V. 3, n. 1, p. 13-22.
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Shan Yan, A., Cao-Lormeau, V.M., Brout, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill*, 19,pii: 20761.
- Musso, D., Gubler, D.J. (2016). Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*, 29, 487-524.
- Ngono, A. E., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., ... & Shresta, S. (2017). Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary Zika virus infection in mice. *Cell host & microbe*, 21(1), 35-46.
- Ngono, A. E., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., ... & Shresta, S. (2017). Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary Zika virus infection in mice. *Cell host & microbe*, 21(1), 35-46.
- Nicastri, E., Castilletti, C., Liuzzi, G., Iannetta, M., Capobianchi, M.R., Ippolito, G. (2016). Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro Surveill*, 21.
- Nikolay, A., Castilho, L.R., Reichl, U., Genzel, Y. (2017). Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine*, pii: S0264-410X,30324-9.

- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell stem cell*, 18(5), 591-596.
- Oliveira Melo, A.S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P.O., Alves Sampaio, S., Bispo de Filippis, A.M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*, 47,6-7.
- Olson, J.G., Ksiazek, T.G., Suhandiman, Triwibowo. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75,389-93.
- Ornelas, A. M., Pezzuto, P., Silveira, P. P., Melo, F. O., Ferreira, T. A., Oliveira-Szejnfeld, P. S., ... & Cardoso, C. C. (2017). Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. *Annals of neurology*, 81(1), 152-156.
- Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, S. M., & Richer, M. J. (2017). Analysis of the T cell response to Zika virus and identification of a novel CD8+ T cell epitope in immunocompetent mice. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006184.
- Passemard, S., Kaindl, A.M., Verloes, A. (2013). Microcephaly. *Handb. Clin. Neurol*, 111,129–141.
- Pierson, T.C., Kielian, M. (2013). Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol*, 3,3-12.
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., Petersen, L. R. (2016). Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *New Engl. J. Med*. 374, 1981–1987.
- Reefhuis, J., Gilboa, S.M., Johansson, M.A., Valencia, D., Simeone, R.M., Hills, S.L., Polen, K., Jamieson, D.J., Petersen, L.R., Honein, M.A. (2016). Projecting Month of Birth for At-Risk Infants after Zika Virus Disease Outbreaks. *Emerg Infect Dis*, 22,828-32.
- Richard, A. S., Shim, B. S., Kwon, Y. C., Zhang, R., Otsuka, Y., Schmitt, K., ... & Choe, H. (2017). AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201620558.
- Rossi, S.L., Tesh, R.B., Azar, S.R., Muruato, A.E., Hanley, K.A., Auguste, A.J., Langsjoen, R.M., Paessler, S., Vasilakis, N., Weaver, S.C. (2016). Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg*, 94,1362-9.
- Sainz, B., & Chisari, F. V. (2006). Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *Journal of virology*, 80(20), 10253-10257.
- Samuel, M.A., Diamond, M.S.(2005). Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol*. 79,13350-61.
- Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D. (2015). *Introdução à Virologia Humana*. 3. ed.
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E.M., Feitosa, I.M., Horovitz, D.D., Cavalcanti, D.P., Pessoa, A., Doriqui, M.J., Neri, J.I., Neto, J.M., Wanderley, H.Y., Cernach, M., El-Husny, A.S., Pone, M.V., Seroo, C.L., Sanseverino, M.T. Brazilian Medical Genetics Society–Zika Embryopathy Task Force. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65,59-62.
- Shen, S., Shi, J., Wang, J., Tang, S., Wang, H., Hu, Z., & Deng, F. (2016). Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virologica Sinica*, 31(2), 118-130.
- Simonin, Y., Loustalot, F., Desmetz, C., Foulongne, V., Constant, O., Fournier-Wirth, C., Leon, F., Molès, J.P., Goubaud, A., Lemaitre, J.M., Maquart, M., Leparç-Goffart, I., Briant, L., Nagot, N., Van de Perre, P., Salinas, S. (2016). Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine*, 12,161-169.

- Simpson, D.I. (1964). Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1964, 58,335-8.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T.C., Rossmann, M.G., Kuhn, R.J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352,467-70.
- Spindler, K.R., Fang, L., Moore, M.L., Hirsch, G.N., Brown, C.C., Kajon, A. (2001). SJL/J mice are highly susceptible to infection by mouse adenovirus type 1. *J Virol*, 75,12039-46.
- Suwanmanee, S., Luplertlop, N. (2017). Immunopathogenesis of Dengue Virus-Induced Redundant Cell Death: Apoptosis and Pyroptosis. *Viral Immunol*, 30,13-19.
- Swaminathan, S., Schlaberg, R., Lewis, J., Hanson, K.E., Couturier, M.R. (2016). Fatal Zika Virus Infection With Secondary Nonsexual Transmission. *N Engl J Med*, 375,1907-1909.
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Harris, E., Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe*, 20,155-66.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., Christian, K.M., Didier, R.A., Jin, P., Song, H., Ming, G.L. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, 18,587-90.
- Tappe, D., Pérez-Girón, J.V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D.F., Jaenisch, T., Gómez-Medina, S., Günther, S., Bartoloni, A., Muñoz-Fontela, C., Schmidt-Chanasit, J. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*, 205,269-73.
- Tricarico, P.M., Caracciolo, I., Crovella, S., D'Agaro, P. (2017). Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochem Biophys Res Commun*, pii: S0006-291X,30226-7.
- Tripathi, S., Balasubramaniam, V. R., Brown, J. A., Mena, I., Grant, A., Bardina, S. V., ...& Albrecht, R. A. (2017). A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS pathogens*, 13(3), e1006258.
- Vasilakis, N., Weaver, S.C. (2016). Flavivirus transmission focusing on Zika. *Current opinion in Virology*. 22, 30-35.
- Vermillion, M. S., Lei, J., Shabi, Y., Baxter, V. K., Crilly, N. P., McLane, M., ... & Burd, I. (2017). Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. *Nature Communications*, 8.
- Vermillion, M.S., Lei, J., Shabi, Y., Baxter, V.K., Crilly, N.P., McLane, M., Griffin, D.E., Pekosz, A., Klein, S.L., Burd, I. (2017). Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. *Nat Commun*, 8,14575.
- von der Hagen, M., Pivarsci, M., Liebe, J., von Bernuth, H., Didonato, N., Hennermann, J.B., Bühner, C., Wiczorek, D., Kaindl, A.M. (2014). Diagnostic approach to microcephaly in childhood: a two-center study and review of the literature. *Dev Med Child Neurol*, 56,732-41.
- Wang, J.N., Ling, F. (2016). Zika Virus Infection and Microcephaly: Evidence for a Causal Link. *Int J Environ Res Public Health*, 13,pii: E1031.
- Way, J.H., Bowen, E.T., Platt, G.S. (1976). Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice. *J Gen Virol*, 30,123-30.
- Weaver, S.C., Costa, F., Garcia-Blanco, M.A., Ko, A.I., Ribeiro, G.S., Saade, G., Shi, P.Y., Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*, 130,69-80.
- Weisblum, Y., Oiknine-Djian, E., Vorontsov, O. M., Haimov-Kochman, R., Zakay-Rones, Z., Meir, K., ...& Bronstein, M. (2017). Zika virus infects early- and mid-gestation human maternal decidual tissues, inducing distinct innate tissue responses in the maternal-fetal interface. *Journal of virology*, 91(4), e01905-16.

WHO,2016.<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>

Winkler, C.W., Myers, L.M., Woods, T.A., Messer, R.J., Carmody, A.B., McNally, K.L., Scott, D.P., Hasenkrug, K.J., Best, S.M., Peterson, K.E. (2017). Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. *J Immunol*, 198,3526-3535.

Woods, C.G. (2004). Human microcephaly. *Curr Opin Neurobiol*, 14,112-7.

Wu, J., Huang, D.Y., Ma, J.T., Ma, Y.H., Hu, Y.F. (2016). Available Evidence of Association between Zika Virus and Microcephaly. *Chin Med J (Engl)*, 129,2347-56.

Xavier-Neto, J., Carvalho, M., Pascoalino, B.D., Cardoso, A.C., Costa, Â.M., Pereira, A.H., Santos, L.N., Saito, Â., Marques, R.E., Smetana, J.H., Consonni, S.R., Bandeira, C., Costa, V.V., Bajgelman, M.C., Oliveira, P.S., Cordeiro, M.T., Gonzales Gil, L.H., Pauletti, B.A., Granato, D.C., Paes Leme, A.F., Freitas-Junior, L., Holanda de Freitas, C.B., Teixeira, M.M., Bevilacqua, E., Franchini, K. (2017). Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: A developmental study. *PLoS Negl Trop Dis*, 11,e0005363.

Yuan, L., Huang, X. Y., Liu, Z. Y., Zhang, F., Zhu, X. L., Yu, J. Y., ... & Wang, H. J. (2017). A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, eaam7120.

Yuki, N., Hartung, H.P.(2012). Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med*, 366,2294-304.

Yun, S.I., Lee, Y.M. (2014). Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 10,263-79.
Zanluca, C., Melo, V.C., Mosimann, A.L., Santos, G.I., Santos, C.N., Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110, 569-72.

Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J*. 22,2604-13.

Zhang, Y., Kaufmann, B. Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G.(2007). Structure of immature West Nile virus. *J Virol*, 81,6141-5.

Zhu, Z., Chan, J.F., Tee, K.M., Choi, G.K., Lau, S.K., Woo, P.C., Tse, H., Yuen, K.Y. (2016). Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg Microbes Infect*, 16;5:e22.

ANEXO 1

Artigo: Development of standard methods for Zika virus propagation, titration,
and purification

(Publicado)

ANEXO 2

Artigo: Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption

(Submetido)

ANEXO 3

Artigo: An essential role of CD4+ T cells, IFN- γ and B cells in the control of ZIKV infection

(Submetido)