

Vinicius Guimarães Suzart Silva

IMPORTÂNCIA DO IFN γ NO CONTROLE DA
INFECÇÃO POR ZIKV EM MODELO MURINO



**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
DEZEMBRO / 2017

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marcelo Torres Bozza e coorientação de Carolina Gonçalves de Oliveira Lucas.

FICHA CATALOGRÁFICA

GV785i Guimarães Suzart Silva, Vinicius
IMPORTÂNCIA DO IFN γ NO CONTROLE DA INFECÇÃO
POR ZIKV EM MODELO MURINO / Vinicius Guimarães
Suzart Silva. -- Rio de Janeiro, 2017.
62 f.

Orientador: Marcelo Torres Bozza. Coorientadora:
Carolina Gonçalves de Oliveira
Lucas.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. ZIKV. 2. infecção. 3. resposta imune adaptativa. 4.
IFN γ . 5. proteção. I. Torres Bozza, Marcelo, orient. II.
Gonçalves de Oliveira Lucas, Carolina, coorient. III.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Guimarães Suzart Silva

IMPORTÂNCIA DO IFN γ NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR ZIKV EM MODELO MURINO

Rio de Janeiro, 08 de dezembro de 2017

(Prof. Dr. Alberto Félix Nobrega – IMPG)

(Dr. Edson Oliveira Delatorre – FIOCRUZ)

(Dr. Fábio Barrozo do Canto – IMPG)

(Prof. Dra. Iranaia Assunção Miranda – IMPG)

*Para a minha querida e amada mãe,
ser nobre de alma e pura de coração.
Minha redenção e alicerce. Fonte de
inspiração, força e alegria.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço todo o apoio, incentivo e motivação dados a mim, desde o ventre, por minha mãe. Desde pequeno, sonhando alto e fora da minha realidade, fui estimulado por minha mãe a correr atrás dos meus sonhos e a continuar sonhando, porque um dia eu conquistaria tudo aquilo que fosse meu por merecimento. O sonho de estudar em uma universidade de excelência e prestígio, como a UFRJ, só se tornou realidade graças a minha mãe, a quem devo minha vida e conquistas. O meu sucesso é por você, mãe! Lutarei para honrar todas as batalhas diárias que você enfrentou para eu chegar onde cheguei, e a ir aonde a ciência me levar. Obrigado!

Agradeço à minha família por todo amor, suporte emocional e financeiro, que me permitiram viver a experiência do ensino superior na UFRJ. Agradeço do fundo do coração por sempre terem acreditado em mim. À minha querida irmã Silvia, obrigado por ser minha eterna companheira, meu porto seguro, minha gêmea dois anos e meio mais velha, e uma de minhas fontes de inspiração e admiração. Obrigado por sonhar comigo e por me apoiar aonde quer que eu vá! Serei eternamente grato por tudo o que você fez e faz por mim. Ao meu irmão Dennis, nobre de alma, agradeço por todas as atitudes de carinho e respeito, por todo amor e alegria que me proporciona sempre! Ao meu irmão Kevin, puro de coração, obrigado por todos os ensinamentos que me proporcionou. Vocês, meus irmãos, desde pequenos são meus companheiros de aventuras e enchem minha vida de alegria e aprendizado. Sou grato por ter nascido na família que nasci e por ter vocês como amigos eternos! Agradeço ao meu querido tio David, por ter sido o pai que nunca tive, por ser uma das pedras fundamentais do ser humano que sou. Agradeço todo o carinho e investimento que você sempre dedicou a mim. Muito obrigado! Agradeço a todos os meus outros familiares que, mesmo indiretamente, estiveram presentes na minha vida e apostaram suas energias positivas em mim. Às minhas primas Natasha, Ghísela, Ingrid, Isadora e Amanda, e primos, Pedro, Gabriel e Guilherme, obrigado por serem pessoas tão preciosas para mim. Às minhas tias Rosemeire e Rosely, e aos meus tios Walter e Walter, obrigado por serem pessoas especiais e carinhosas comigo. À minha avó Irani e avô Chico, meu amor. À minha bisavó Lídia, minha admiração e respeito.

Agradeço do fundo do meu coração a todas as pessoas maravilhosas que pude conhecer e que participaram da minha jornada no Rio de Janeiro. Às minhas amigas Luana e Érika, minhas irmãs e fiéis escudeiras, muito obrigado por terem estado comigo desde o início dessa aventura. Vocês me proporcionaram momentos únicos e inesquecíveis, que me marcaram para sempre! Minha vida é mais feliz graças a vocês. Todos os sorrisos, todas as praias, cervejas, sambas, forró,

acroyoga e festas estarão para sempre comigo! Obrigado por me motivarem quando tudo pareceu impossível. Às minhas irmãs de graduação, às minhas lindas e eternas companheiras Paula e Júlia, agradeço de todo coração o companheirismo e afeto de vocês. Fico feliz por todas as fofocas nos corredores, por todos os almoços, pelas festinhas regadas na casa da Paula e mil e um outros momentos que passamos juntos. Sem vocês, a minha graduação seria sem cor. Vocês me enchem de alegria! Às minhas tão queridas e divertidas amigas Carol, Lana e Michelle, muito obrigado por me proporcionarem tantos momentos divertidos e tantas fofocas quentes. Vocês são demais! Lana, obrigado por sempre ter sido solícita comigo. Michelle, pessoa tão boa e justa, obrigado por estar sempre me colocando para cima e por confiar em mim. À minha co-orientadora e amiga Carol, muito obrigado por sua amizade, lealdade e parceria. Obrigado por me ensinar ciência de qualidade e por ser tão louca quanto eu. Você é uma cientista incrível e espero que, no futuro, nossos caminhos se cruzem e que possamos comemorar nossas conquistas juntos. Muito obrigado! Ao meu irmão Lucas Mendes, agradeço por sempre estar comigo, desde o trote, em tudo o que faço. Obrigado por me proporcionar experiências incríveis e por ser meu parceiro. Todas as caninhas que sobrevivemos, todas as choppadas que fomos juntos com o Tauan, outro irmão incrível, e todas as ressacas que compartilhamos estarão para sempre comigo. Muito obrigado! Ao querido amigo William, muito obrigado por ser essa pessoa divertida, humilde e incrível que é! A família Magé faz a força! Ao Igor, Matheus e Sharton, agradeço por terem estado comigo desde o começo, e por compartilharem feitos e apuros comigo por toda a graduação. Às minhas amigas Andressa, Isabella, Giovanna, Carolina e Larissa, obrigado por sempre terem sido pessoas tão gentis, carinhosas e alegres comigo e por estarem comigo em vários momentos felizes. Vocês são muito queridas! Obrigado ao Thiago, Eduardo, Renato, Pâmela e Mariana pelo carinho de vocês. A todos os meus outros colegas de graduação, não menos importantes, conseguimos enfrentar essa loucura toda juntos! Parabéns! Aos meus queridos amigos e veteranos Fábio, Bia, Sidcley, Maria, Ana Flávia, Maria Clara, Joana, Lucas, Bruno César, Pedro e Maurício agradeço de todo o coração o acolhimento e carinho que tiveram por mim. Agradeço por me agregarem momentos incríveis e felizes durante esses quatro anos de Rio de Janeiro!

Aos meus camaradas da Biologia: Hugo, Thiago, Amanda, Tammy, Luiza, Marta, Jairo, Gabriel, Ingrid, Arthur, Karen, Eudes, Daian, Flávia, Vicente, Ruivo e todos aqueles que me proporcionaram experiências alucinantes e divertidas durante o InterBio, Doces, HFs, FDCs e choppeladas, muito obrigado! Ter participado de todas as confraternizações da Bio fez da minha graduação feliz. Que onda!

Agradeço do fundo do coração aos meus amigos e companheiros de república, que me proporcionaram incontáveis alegrias e que fizeram da minha casa, um lar. Ao meu querido amigo Filipe, que chegou sozinho no Rio tão perdido quanto eu, muito obrigado por ter sido *that gorgeous beautiful young woman* e por compartilhar tantas experiências comigo. Aos meus amigos Sérgio, Lucas e André, que fizeram do perrengue um estilo de vida feliz, muito obrigado! Aos meus irmãos Tales e Lucas, o Marti, muito obrigado por serem meus irmãos no Rio de Janeiro. Muito obrigado por todas as nossas trilhas, praias, conversas e exercícios físicos noturnos no mirante do Jardim Guanabara, além de tantas reflexões incríveis sobre vida, universo, aviação, física, gastronomia e meteorologia que tivemos juntos. Vocês são pessoas maravilhosas que quero levar para sempre comigo.

Ao Fred, meu instrutor querido e grande mestre da natação da UFRJ, agradeço por me permitir cuidar de minha saúde física e mental durante a graduação. Sem a energia da grande piscina legado, e dos bons companheiros de natação que fiz, tudo seria mais difícil.

Ao querido André, da secretaria da graduação, que me ajudou inúmeras vezes com burocracias, notas e outras papeladas, obrigado por tudo! Sem você, tudo seria dez vezes mais complicado, chato e demorado.

Aos meus incríveis mentores da graduação, muito obrigado por me ensinarem o universo da Microbiologia e Imunologia. Um agradecimento especial ao professor Sérgio Fracalanza, um ser humano incrível, que sempre esteve disposto a conversar sobre meu futuro e a planejá-lo comigo. Agradeço às professoras Luciana Arruda, Fernanda Abreu, Renata Meirelles e Lígia Peçanhapor todo carinho que dedicaram a mim. Agradeço aos cientistas que me avaliaram e me criticaram durante todas as avaliações da graduação e monografia. Sem vocês eu não poderia evoluir e ascender na minha, até então precoce, carreira científica. Muito obrigado!

Um agradecimento, em especial, aos dois grandes cientistas que me orientaram durante a minha graduação, que me estimularam e me ensinaram ciência e a persistir nessa carreira tão nobre. À Dra. Luciana Costa, cientista admirável, obrigado por me receber em seu laboratório e a me introduzir na pesquisa do HIV. Agradeço a oportunidade singular de ter participado de avanços no entendimento deste vírus. Agradeço ao Dr. Marcelo Bozza, cientista brilhante e amigo, por ter me acolhido em seu laboratório e ter me dado a excelente oportunidade de pesquisar o ZIKV. Meu mais sincero respeito e admiração por você! Agradeço também a todo aprendizado e discussões científicas que tive durante a minha experiência em meus dois laboratórios. À equipe do LAGIIVIR, agradeço por todos os momentos felizes que me proporcionaram. Com vocês, evoluí e me diverti muito! Em especial, agradeço a minha primeira parceira de bancada, minha querida

amiga Sara, por ter me ensinado muito durante a minha iniciação científica. Sou muito grato e agradeço por ter tido a oportunidade maravilhosa de trabalhar como você! À equipe do Laboratório de Inflamação e Imunidade, muito obrigado por me receberem de forma calorosa e por acreditarem em meu potencial. Em especial, ao querido Jamil, colega de bancada, parceiro de biotério e experimentos, obrigado por sempre ter sido gentil e solícito e por me ensinar ciência. Aprendo muito com você. À querida Sheila, do programa de pós graduação em Imunologia e Inflamação, agradeço por ter dado todo o suporte burocrático para minha permanência na iniciação científica, orientado pelo Marcelo.

Por fim, gostaria de agradecer a toda energia que coordena a minha vida e minhas ações, por nunca me deixar desistir, por me deixar falhar e aprender, por nunca se ausentar de mim e por me impulsionar a conquistar um futuro brilhante. Começamos juntos e terminaremos juntos.

RESUMO

Vinicius Guimarães Suzart Silva

IMPORTÂNCIA DO IFN γ NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR ZIKV EM MODELO MURINO

Orientador: Dr. Marcelo Torres Bozza

Co-orientadora: Carolina Gonçalves de Oliveira Lucas

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

O Zika vírus (ZIKV) se disseminou amplamente pelo cinturão equatorial do planeta nos últimos setenta anos, diferenciando-se em três linhagens virais, duas africanas e uma asiática. Negligenciado, este flavivírus causou uma grande epidemia nas Américas nos últimos anos, tornando-se um grave problema de saúde pública. Por esta razão, faz-se necessário elucidar o padrão de resposta imune desencadeada no hospedeiro e os mecanismos envolvidos no controle da infecção por ZIKV, a fim de se obter medidas profiláticas capazes de reduzir os índices de mortalidade e morbidade associados ao ZIKV. Utilizando duas cepas virais de linhagens diferentes do ZIKV, a cepa histórica africana MR766 e a cepa contemporânea asiática PE243, tivemos como objetivo avaliar em modelo murino imunodeficiente, além de divergências na progressão da infecção, a reposta imune adaptativa celular desenvolvida frente à infecção pelo ZIKV. A partir da infecção de um modelo susceptível de animais A129, deficiente para o gene do receptor de IFN do tipo I, de quatro semanas, com um inóculo viral de $2,0 \times 10^5$ PFU, por via intravenosa, descrevemos que a ativação do sistema imune ocorre de forma diferente de acordo com a cepa viral utilizada. Além disso, identificamos determinados componentes do sistema imune do hospedeiro, tais como células T CD4+ que apresentam intensa proliferação celular e produção de interferon gama (IFN γ), durante a infecção frente a tais cepas, têm uma influência direta na sobrevivência dos animais. Análises por citometria de fluxo demonstraram que a cepa asiática PE243 induz a ativação de linfócitos T, com aumento da expressão de marcadores de ativação e um aumento na produção de citocinas, como o IFN γ , de maneira mais robusta do que a cepa africana MR766, a qual é letal para camundongos A129. Contudo, a transferência adotiva de linfócitos T CD4+ produtores de IFN γ derivados de camundongos infectados com a cepa PE243, é capaz de proteger da letalidade da infecção pelo desafio com a cepa MR766 em camundongos A129. Camundongos AG129, por sua vez, os quais são deficientes para os genes dos receptores de IFN do tipo I e II, são susceptíveis e sucumbem à infecção por ambas as cepas. Ainda que a transferência adotiva de linfócitos T CD4+ produtores de IFN γ imunes contra a cepa PE243 seja capaz de reverter a letalidade da infecção por ZIKV em camundongos A129, o mesmo resultado não é observado em camundongos AG129. Juntos, estes resultados evidenciam o papel central do IFN γ no controle da infecção de ZIKV em modelos murinos de infecção.

Palavras-chave: ZIKV, camundongos, infecção, resposta imune, IFN γ , proteção.

ABSTRACT**Vinicius Guimarães Suzart Silva****IMPORTANCE OF IFN γ IN THE CONTROL OF
ZIKV INFECTION IN MURINE MODEL****Supervisor: Dr. Marcelo Torres Bozza****Co-supervisor: Carolina Gonçalves de Oliveira Lucas**

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

The Zika virus (ZIKV) has spread widely throughout the equatorial belt of the planet in the last 70 years, differentiating itself into three viral strains, two African and one Asian. Neglected, this flavivirus has caused a major epidemic in the Americas in recent years, becoming a serious public health problem. For this reason, it is necessary to elucidate the pattern of immune response triggered in the host and the mechanisms involved in the control of ZIKV infection, in order to obtain prophylactic measures capable of reducing the mortality and morbidity rates associated with ZIKV. Using two viral strains of different strains of ZIKV, the African historical strain MR766 and the contemporary Asian strain PE243, we aimed to evaluate in immunocompromised murine model, in addition to divergences in the progression of infection, the cellular adaptive immune response developed against ZIKV infection. From the infection of four week old A129 susceptible mice, knockout for the type I IFN receptor gene with a viral inoculum of 2.0×10^5 PFU, intravenously, we describe a different activation of the immune system according to the viral strain used. In addition, we identified that certain components of the host immune system, such as CD4 + T cells exhibiting intense cell proliferation and interferon gamma (IFN γ) production have a direct influence on the survival of the animals upon infection against these ZIKV strains tested. Flow cytometric analysis demonstrated that the PE243 Asian strain induces the activation of T lymphocytes, with increased expression of activation markers and an increase in cytokine production, such as IFN γ , more robustly than the African strain MR766, which is lethal to A129 mice. However, the adoptive transfer of IFN γ -producing CD4 + T lymphocytes derived from mice infected with the PE243 strain is able to protect A129 mice against the lethal challenge with the MR766 strain. AG129 mice, in turn, which are knockout for the genes of the type I and II IFN receptors, are susceptible and succumb to infection by both strains. Adoptive transfer of immune CD4 + T lymphocytes producing IFN γ purified from PE243-infected A129 mice, was able to reverse the lethality of MR766 infection in A129 mice, but not in AG129 mice. Taken together, these results evidence the central role of IFN γ in the control of ZIKV infection in mouse models of infection.

Key-words: ZIKV, mice, infection, immune response, IFN γ , protection.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Histórico, epidemiologia e características genéticas do zika vírus	13
1.2	Transmissão e infectividade do ZIKV	21
1.3	Resposta imunitária contra o ZIKV	23
1.4	Modelos murinos experimentais para estudo do ZIKV	27
1.5	Prevenção e tratamento	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivos específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Preparações celulares	34
4.2	ZIKV	34
4.3	Animais	35
4.4	Inoculação viral	35
4.5	Análise da carga viral por PCR em tempo real	35
4.6	Análise da produção de citocinas e análise fenotípica dos esplenócitos totais por citometria de fluxo	36
4.7	Marcação com CFSE	38
4.8	Purificação de linfócitos T CD4+	38
4.9	Transferência adotiva	39
4.10	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Infecção de camundongos 129 WT com a cepa africana do ZIKV MR766	40
5.2	Infecção de camundongos A129 com a cepa africana do ZIKV MR766	41
5.3	Infecção de camundongos 129 WT com a cepa asiática do ZIKV PE243	42
5.4	Análise da carga viral em camundongos A129 infectados com a cepa africana MR766 vs. camundongos A129 infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV	43
5.5	Análise do perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos T de camundongos A129 infectados com a cepa africana MR766 vs. camundongos A129 infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV	43
5.6	Avaliação do papel protetor da transferência adotiva de linfócitos T CD4+ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243 do ZIKV em camundongos A129 infectados com a cepa MR766	46
5.7	Avaliação do papel protetor da transferência adotiva de linfócitos T CD4+ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243 do ZIKV em camundongos AG129 infectados com a cepa MR766	48
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÕES	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico, epidemiologia e características genéticas do zika virus

A fim de compreender mais sobre os ciclos urbano e silvestre do vírus da Febre Amarela (YFV) e avaliar a ocorrência de outras arboviroses, a Fundação Rockefeller financiou um estudo de vigilância epidemiológica no continente africano, alocando macacos *Rhesus* sentinelas em florestas tropicais, em abril de 1947 (Dick *et al.*, 1952). No mesmo ano, um dos macacos do estudo desenvolveu febre seguida de morte na floresta tropical de Zika, localizada na península de Entebbe, em Uganda (Dick, 1952; Dick *et al.*, 1952). A partir da amostra de sangue do primata, um novo vírus foi isolado, sendo a estirpe viral catalogada como MR766. Atualmente, essa estirpe representa o arquétipo africano do vírus da Zika (ZIKV), nomeado em homenagem à floresta de onde foi descrito. No ano seguinte, no mesmo local, o ZIKV foi também isolado de mosquitos *Aedes africanus*, espécie endêmica na região da África Oriental (Haddow *et al.*, 1964; Weinbren e Williams, 1958).

Até meados da década de 1950, a presença de anticorpos neutralizantes na população de Uganda e Nigéria contra o ZIKV era baixa, com prevalência de 10% a 20%, sem indicativo de quaisquer manifestações clínicas ocasionadas por este patógeno (Dick, 1953). Esse dado pode indicar tanto que o vírus circulou nessa região, gerando casos assintomáticos de infecção, quanto a possibilidade de reatividade cruzada nos testes sorológicos realizados na população com outros flavivírus circulantes na Uganda e Nigéria antes da década de 1950.

Os primeiros casos reportados de doença envolvendo o ZIKV aconteceram em 1954, durante um surto de icterícia e febre no leste da Nigéria. O ZIKV foi isolado do soro de uma paciente de 10 anos, que apresentava febre alta e dor de cabeça (Macnamara, 1954). Programas de vigilância constataram a circulação periódica de outra cepa do ZIKV, no Senegal e em parte do oeste do continente africano, desde 1968, a qual foi catalogada de 41671-DAK (Faye *et al.*, 2014). Na Ásia, a primeira detecção do ZIKV e de indicação de possível transmissão deste patógeno através de um vetor urbano ocorreu em 1969, quando o vírus foi isolado de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* coletados em cidades da Malásia, no sudeste asiático (Marchette *et al.*, 1969). A estirpe viral isolada dos mosquitos da península Malásia era diferente da MR766 isolada em Uganda, sendo a primeira cepa não-africana do ZIKV descrita. Referida como linhagem asiática

do ZIKV, o novo vírus foi catalogado como P6-740 (Haddock *et al.*, 2012; Marchette *et al.*, 1969). O primeiro diagnóstico do vírus em humanos na região foi em 1978, a partir de dados sorológicos que comprovaram a soroconversão contra o ZIKV (Olson *et al.*, 1981).

O vírus foi detectado em diferentes países africanos e asiáticos nos 40 anos seguintes, evidenciando sua expansão geográfica. Embora a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada entre os anticorpos contra o ZIKV com outros flavivírus torne os dados de circulação do vírus naquela época, de certa forma, imprecisos, dispersão do patógeno da África para a Ásia, com consequente divergência genética, pode estar relacionado com a ampla distribuição e endemia de mosquitos do gênero *Aedes*, vetores em potencial para a manutenção do vírus tanto na natureza quanto em centros urbanos (Oehler *et al.*, 2014; Lanciotti *et al.*, 2008; Smithburn, 1952).

Há duas linhagens africanas do ZIKV descritas até o momento e os vírus pertencentes a estas foram isolados majoritariamente de mosquitos vetores em enzootias (Song *et al.*, 2017; Ioos *et al.*, 2014). O primeiro isolado descrito do ZIKV foi catalogado de MR766, e este representa o arquétipo viral da primeira linhagem do ZIKV descrita na história (Dick *et al.*, 1952). Este vírus, isolado em Uganda, é idêntico a outros espécimes isolados que circularam em países próximos, como a República Centro-Africana, no período dos anos de 1947-2001. Já os vírus pertencentes à outra linhagem africana do ZIKV, por sua vez foram descritos a partir da análise clínicos na Nigéria e Senegal, no período dos anos de 1968-1997. A cepa 41671-DAK, isolada no Senegal, representa o arquétipo viral de referência da sua linhagem (Faye *et al.*, 2014).

O primeiro grande surto de infecção por ZIKV ocorreu em 2007. O vírus circulante pertence à linhagem asiática, que é representado pela cepa P6-740 da Malásia, que se dispersou ao longo da região sudeste do continente asiático e esteve sempre envolvido com casos de infecção em humanos e, potencialmente, mais adaptada a zonas urbanas (Haddock *et al.*, 2012). Estima-se que cerca de 70% da população residente da Ilha Yap, nos Estados Federados da Micronésia, com idades de três anos ou mais, foi infectada pelo vírus. No início, o agente etiológico suspeito de causar o surto era o vírus da Dengue (DENV), porém, a partir de resultados em RT-PCR e testes sorológicos de amostras de sangue de pacientes, foi constatada a presença de RNA viral e anticorpos neutralizantes específicos contra o ZIKV (Duffy *et al.*, 2009; Lanciotti *et al.*, 2008). Um em cada cinco pacientes infectados apresentaram manifestações clínicas como febre, artralgia, conjuntivite, *rash* cutânea e artrite (Lanciotti *et al.*, 2008). A espécie *Aedes (Stegomyia) hensilli* foi indicada como sendo o principal vetor em potencial do surto, por ser abundante na Micronésia e ter sido o vetor nos surtos

de DENV na Ilha (Ledermann *et al.*, 2014). Análises filogenéticas de vírus isolados em amostras de sangue de pacientes, indicaram que o ZIKV foi introduzido na Oceania pelo Sudeste Asiático (Duffy *et al.*, 2009). Ainda em 2007, pessoas residentes de cidades no norte do Gabão, e de sua capital, Libreville, apresentaram febre acompanhada de dores intensas como manifestações clínicas mais recorrentes. O ZIKV foi confirmado como agente etiológico dos surtos após ter sido encontrado no soro de pacientes e em amostras de mosquitos da espécie *Aedes albopictus* coletados nas cidades gabanesas envolvidas no ocorrido, indicando esta como a principal espécie vetor do surto (Grard *et al.*, 2014). Nos anos seguintes, casos esporádicos de infecção por ZIKV foram reportados em países do Sudeste Asiático, como Camboja, Tailândia, Malásia, Indonésia e Filipinas (Alera *et al.*, 2015; Buathong *et al.*, 2015; Tappe *et al.*, 2015; Tappe *et al.*, 2014; Kwong *et al.*, 2013; Heang *et al.*, 2012).

A primeira grande epidemia do ZIKV aconteceu em 2013 nas ilhas da Polinésia Francesa, no Oceano Pacífico, com cepas filogeneticamente relacionadas à linhagem asiática do vírus. Embora nenhuma morte tenha sido notificada, cerca de 29.000 pessoas infectadas pelo vírus foram atendidas em postos de saúde e hospitais da região, correspondendo a aproximadamente 11% da população residente nas 67 ilhas. Nesse episódio, foi a primeira vez que o ZIKV foi associado ao desenvolvimento de quadros clínicos mais severos (Cao-Lormeau *et al.*, 2014; ECDC, 2014). Um total de 72 pacientes manifestaram complicações neurológicas ou autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré (GBS), sendo 74% desses pacientes do sexo masculino. A ocorrência de complicações neurológicas envolvendo o ZIKV esteve potencialmente atrelada a possíveis casos e co-infecções com outros flavivírus, como Chikungunya (CHIKV) e Dengue (DENV), uma vez que ocorreram surtos de DENV-1 e DENV-3, concomitantemente, nas Ilhas (ECDC, 2014; Oehler *et al.*, 2014), no entanto, a correlação entre co-infecções e complicações neurológicas ainda não foi elucidada. O inseto vetor mais provável para a manutenção da epidemia de 2013 foi o mosquito *Aedes (Stegomyia) polynesiensis*, devido a isolamentos do ZIKV e RNA viral de amostras coletadas nas ilhas do arquipélago (Lanciotti *et al.*, 2008).

Ainda em 2013, e início de 2014, foram reportados os primeiros casos não autóctones de infecção por ZIKV em outros países do pacífico (Kutsuna *et al.*, 2014; Pyke *et al.*, 2014). De Janeiro a Maio de 2014, na Ilha de Páscoa, território chileno, foram confirmados 51 casos de infecção por ZIKV, sendo estes os primeiros casos autóctones reportados no hemisfério ocidental. Análises filogenéticas revelaram que o vírus era muito similar ao circulante na Polinésia Francesa

(Tognarelli *et al.*, 2016).

Os primeiros casos de ZIKV no Brasil aconteceram na região nordeste, no final de 2014 e início de 2015 (Campos *et al.*, 2015). Muito embora a maior parte dos indivíduos infectados pelo vírus tenham apresentado quadros assintomáticos, casos de febre associada a doença exantemática, conjuntivite e artralgia foram relatadas no surto. Em 29 de abril de 2015, a capital da Bahia, Salvador, foi a primeira cidade a anunciar o ZIKV como o agente etiológico do surto no nordeste, a partir de análises por RT-PCR positivas de 24 pacientes da cidade de Camaçari, região metropolitana da capital (Campos *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2015; Zanluca *et al.*, 2015). Até o final de 2015, de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos, com quadro clínico semelhante aos reportados no nordeste, ocorreram em outros estados, afetando rapidamente todas as regiões do Brasil (Hennessey *et al.*, 2016; WHO, 2015).

Em paralelo, até fevereiro de 2016, ainda que se afirme imprecisão dos dados por falhas no diagnóstico, o número de recém-nascidos com microcefalia na região nordeste do Brasil aumentou (Frank *et al.*, 2016), com mais de 5.000 casos notificados pelo Ministério da Saúde. Embora este aumento represente cerca de 20 vezes mais ocorrências de microcefalia em recém-nascidos na média histórica para o período, quando comparado com cinco anos anteriores, estima-se que apenas 37% dos casos estejam envolvidos com infecção congênita pelo ZIKV (Paixão *et al.*, 2016; WHO, 2016). Em adição, aproximadamente 120 mortes relacionadas a má-formação congênita em recém-nascidos estão relacionadas às infecções de gestantes pelo ZIKV. Durante o surto, gestantes que deram à luz bebês com microcefalia haviam apresentado febre, *rash* cutânea e conjuntivite como sintomas mais comuns reportados juntos à infecção (Brasil *et al.*, 2016; Carteaux *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2016).

Levantamento retrospectivo de dados na Polinésia Francesa relativo ao período da epidemia de ZIKV, de 2013-2014, indicou que houve aumento do número de diagnósticos de microcefalia e outras más-formações neurológicas em recém-nascidos na região (Jouannic *et al.*, 2016; Oehler *et al.*, 2014).

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que compreende mais de 70 outros vírus (Kuno *et al.*, 1998). Entre os flavivírus, o ZIKV está geneticamente mais próximo a outros vírus, como DENV, YFV, vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus da febre do Oeste do Nilo (WNV), que também representam grande problema de saúde pública mundial, gerando altos índices de morbidade e mortalidade na população de países em desenvolvimento, localizados

majoritariamente nas zonas tropical e subtropical do globo (Kilpatrick *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2017). Como em qualquer outro flavivírus, o genoma do ZIKV, contido em uma fita simples de RNA polaridade positiva, codifica para três proteínas estruturais: C - capsídeo, prM/M - pré-membrana/membrana, e E - envelope e sete não estruturais: NS1, NS2A, NS2B-NS3, NS4A-NS4B e NS5 (Haddow *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2016).

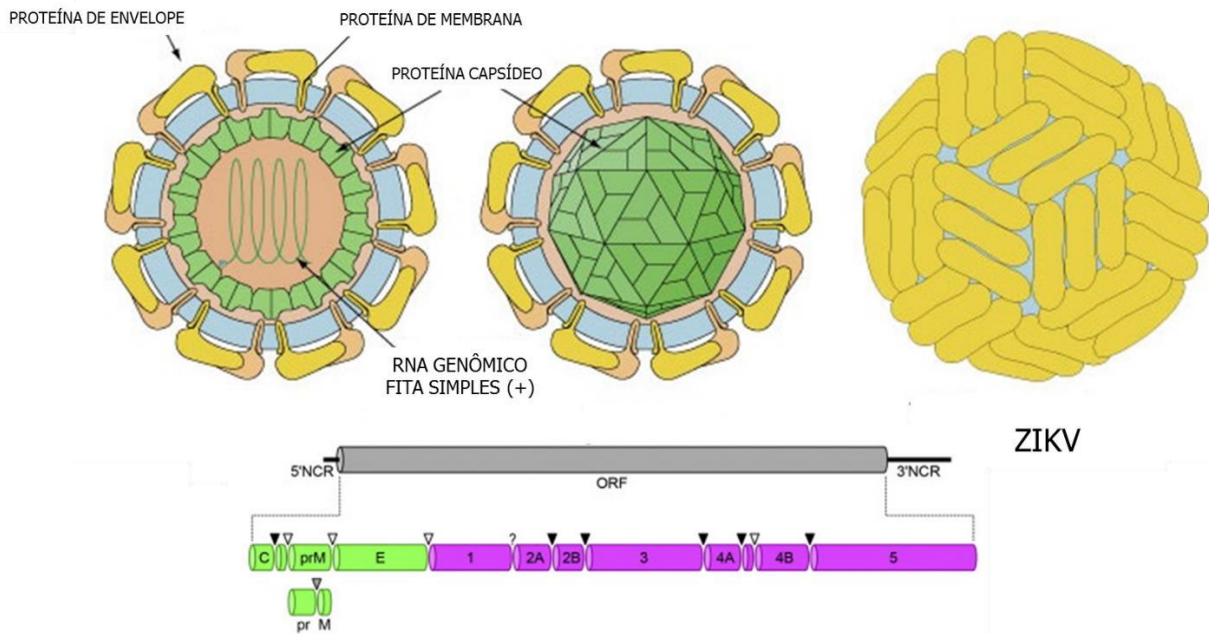


Figura 1 O zika vírus. O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e o seu genoma do ZIKV é codificado em uma fita simples de RNA polaridade positiva, que possui uma única ORF de leitura descrita, codificando para três proteínas estruturais: C - capsídeo, prM/M - pré-membrana/membrana, e E - envelope e sete não estruturais: NS1, NS2A, NS2B-NS3, NS4A-NS4B e NS5 (Adaptado de Viral Zone. Acesso em 22 de junho de 2017. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/39?outline=all_by_species).

A variabilidade genética entre as linhagens do ZIKV ainda não foi completamente elucidada (Wang *et al.*, 2016), contudo, algumas variações moleculares importantes foram descritas na cepa asiática. O genótipo da proteína de envelope do ZIKV africano que circulou entre macacos e mosquitos é idêntico, a partir de amostras isoladas durante a epidemia de 2007, constatou-se que, ao passo que a proteína de envelope da maioria dos flavivírus possui um sítio de glicosilação Asn-X-Ser (Asparagina-X-Serina) na posição 154 (Rabaan *et al.*, 2016), há ausência de glicosilação nessa posição em cepas da linhagem asiática, como nas que circularam nas Américas durante a epidemia de 2015, o que pode ser um forte indicativo putativo de polimorfismos entre as diferentes cepas circulantes do ZIKV no mundo (Metsky *et al.*, 2017; Ramaiah *et al.*, 2017). Há também uma

inserção de 4 a 5 resíduos nas posições 153-156/157 da proteína de envelope de cepas da linhagem asiática do ZIKV, relacionadas com DENV, JEV e WNV e que podem estar relacionadas ao neurotropismo do vírus (Ramaiah *et al.*, 2017; Beasley *et al.*, 2005). Três substituições de aminoácidos foram encontradas no sítio de glicosilação de cepas circulantes na epidemia americana de 2015, filogeneticamente associadas à linhagem asiática do ZIKV, quando comparadas com cepas isoladas de mosquitos antes da epidemia, o que sugere que a conformação das regiões circundantes ao sítio de glicosilação e a presença ou ausência de glicosilação variam entre as cepas de ZIKV, e esta característica pode estar relacionada com o aumento da infecciosidade do vírus em células humanas, fácil transmissão e rápida dispersão do vírus na população (Ramaiah *et al.*, 2017 ; Sirohi *et al.*, 2016). Essa região da proteína de envelope demonstra rápida evolução. Sugere que durante o curso de adaptação do ZIKV em ciclo no mosquito, o vírus adquiriu adaptações no gene codificante da proteína de envelope e que pode ter sofrido ainda mais mudanças para se adaptar ao ciclo replicativo em células humanas. Essas alterações de aminoácidos podem estar relacionadas não somente com a adaptação do vírus a células humanas, como também à pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro sobre os diferentes epítomos presentes no *loop* de fusão da proteína de envelope (Sihori *et al.*, 2016). Yuan *et al.*, em estudo mais recente, descreveram que uma única substituição de aminoácidos, de serina em asparagina na posição 139 (S139N), da proteína precursora de membrana foi capaz de aumentar significativamente a infecciosidade do ZIKV em células progenitoras neurais, tanto de humanos quanto de camundongos. Desta forma, essa mutação pontual pode ter contribuído para o aumento da incidência de casos de microcefalia nas epidemias mais recentes de ZIKV, uma vez que a mutação teve origem antes da epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa, quando foram reportados os primeiros casos de complicações neurológicas decorrentes da infecção pelo ZIKV (Yuan *et al.*, 2017).

Embora muito próxima filogeneticamente à linhagem asiática (Yun *et al.*, 2016), acredita-se que em 2014 foi presenciado o surgimento de uma quarta linhagem no ZIKV no mundo: a linhagem americana (Musso e Gubler, 2016). A linhagem americana, que inclui os vírus isolados no Brasil e Américas, tem como característica marcante, que a diferencia das outras duas linhagens, rápida radiação, que consiste em um padrão de diversificação intenso à medida que a linhagem se dissemina por novos territórios, com populações imunologicamente ainda não expostas ao vírus (Metsky *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017; Musso e Gubler, 2016).

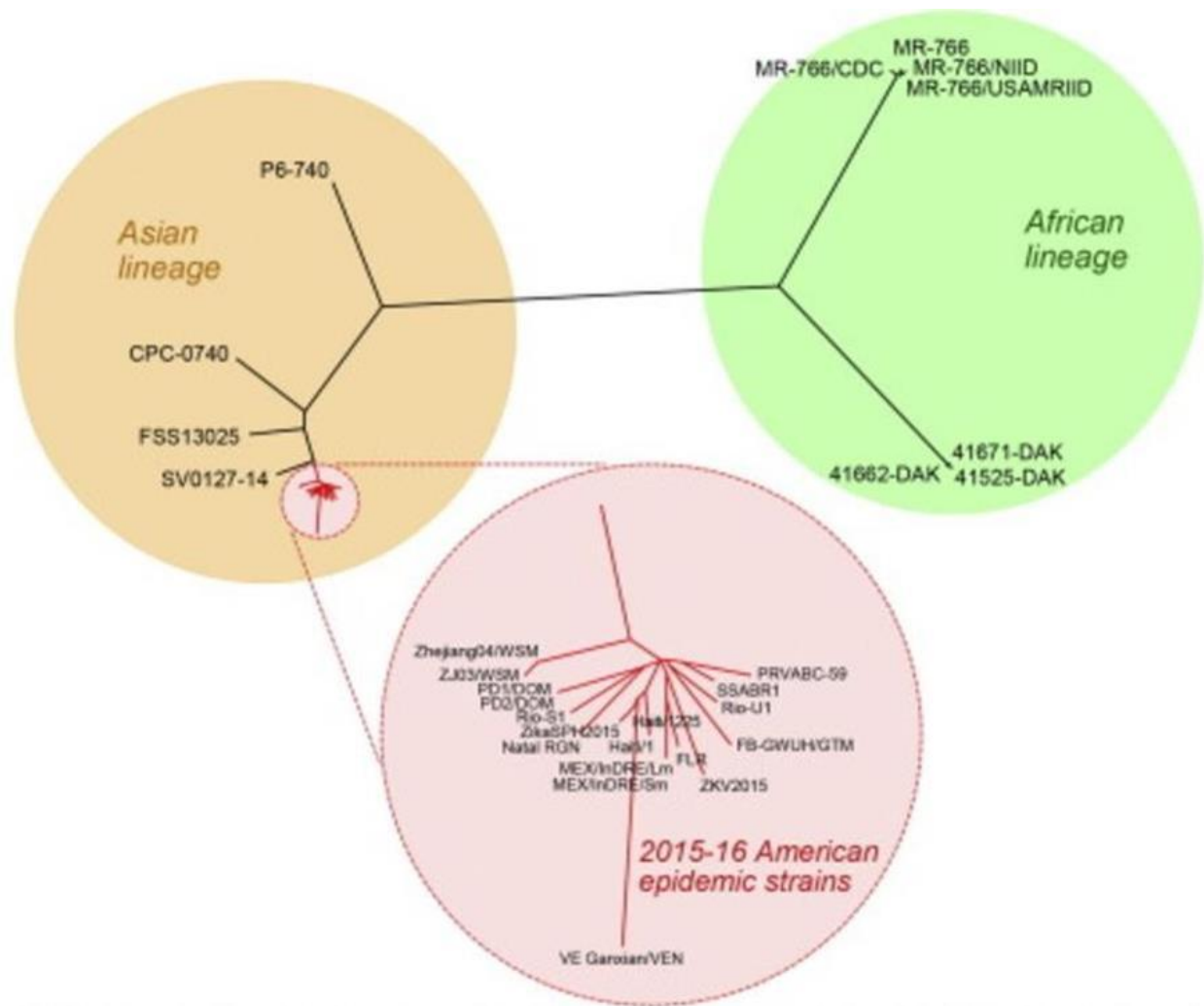


Figura 2 Relação filogenética entre as linhagens africana e asiática do ZIKV. Em verde estão as linhagens africanas do ZIKV, agrupando as cepas do Senegal e de Uganda, cuja qual é o arquétipo africano do ZIKV, a cepa MR766. No círculo laranja está a linhagem asiática do vírus, com a cepa referência desta linhagem, a cepa P6-740. Em rosa, denominadas de “cepas epidêmicas americanas”, estão todas as cepas isoladas e sequenciadas do ZIKV, envolvidas na grande epidemia de meados de 2015. As cepas do vírus que circularam no Brasil (Natal RGN e ZikaSPH2015, por exemplo) durante a epidemia de 2015 são filogeneticamente relacionadas à linhagem asiática e estão agrupadas também no círculo rosa (Adaptado de Song *et al.*, 2017).

Há duas diferentes hipóteses sobre a introdução do vírus no Brasil. A primeira indica que a entrada de turistas e delegações na Copa do Mundo de 2014, sediada em solo brasileiro e com arenas espalhadas em todas as regiões do país, possa ter importado o vírus de outros continentes, apesar de nenhuma seleção de países onde o ZIKV seja endêmico tenha participado do evento. A segunda hipótese, por sua vez, sugere que o vírus entrou no país por outro grande evento, o Campeonato Mundial de Sprint, sediada no Rio de Janeiro em Agosto de 2014, com atletas participando nas corridas de canoagem vindos de quatro países (Ilha de Páscoa, Ilhas Cook, Nova

Caledônia e Polinésia Francesa) que relataram casos de ZIKV no mesmo ano (Musso e Gubler, 2016). Todavia, como os primeiros casos foram relatados no Nordeste, seria mais provável que a introdução do vírus tenha ocorrido nessa região (Campos *et al.*, 2015). O sucesso de dispersão do vírus pelo Brasil e Américas deve-se provavelmente ao fato da grande diversidade da fauna de insetos vetores em potencial, principalmente de mosquitos do gênero *Aedes* tanto em zonas rurais, quanto urbanas nas regiões tropicais e subtropicais do continente (Musso e Gubler, 2016; WHO, 2009).

Desde o surto do Brasil, o ZIKV se alastrou pelo Mundo: América do Sul e Central, ilhas do Caribe, países europeus, o que levou à Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar estado de emergência de saúde pública e de interesse internacional, por um período que perdurou de Fevereiro a Novembro de 2016 (WHO, 2016).

Ao fim de Novembro de 2016, 48 países e territórios nas Américas haviam reportado cerca de 171.500 casos autóctones de infecção pelo ZIKV, apesar de ligeira queda no número de casos em todos os países afetados desde o surto de 2015, exceto no México, Panamá, e nas ilhas de Caicos e Turks (PAHO/WHO, 2016a; PAHO/WHO, 2016b).

Atualmente, o ZIKV ainda representa uma ameaça de pandemia mundial em potencial. O vírus circula nas ilhas do Oceano Pacífico, Sudeste Asiático, Américas, ilhas de Cabo Verde e costa Oeste Africana. Casos não autóctones de infecção pelo ZIKV foram relatados na Austrália, Haváí (EUA), Bélgica, Suíça, Holanda, França, Itália, Espanha e Portugal desde 2015 (CDC, 2016; De Smet *et al.*, 2016; Diaz-Menendez *et al.*, 2016; Duijster *et al.*, 2016; Gyurech *et al.*, 2016; Maria *et al.*, 2016; Nicastri *et al.*, 2016; Pyke *et al.*, 2016; Ze-Ze *et al.*, 2016).



Figura 3 Áreas de risco de infecção pelo ZIKV no mundo. A última atualização do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), Junho de 2017, indica grande risco de infecção pelo ZIKV na zona Equatorial do Globo. Essa região foi palco de todas as epidemias de ZIKV já descritas. A endemia e densidade de vetores em potencial possibilita a manutenção do vírus nas regiões entre os trópicos, além das condições de saneamento básico e controle de vetores ser mais precária em países tropicais, influenciam no *status* de risco das áreas indicadas em roxo, no mapa (Adaptado de CDC, Traveler’s Health, Zika Travel Information <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika>).

1.2 Transmissão e infectividade do ZIKV

Os arbovírus têm como principal característica a transmissão através da picada de vetores artrópode hematófagos entre hospedeiros vertebrados, em maioria mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (Weaver *et al.*, 2016; Diagne *et al.*, 2015). O primeiro isolamento do ZIKV em artrópodes ocorreu em 1948, em amostra e *Aedes africanus* coletados em Ziika, Uganda (Haddow *et al.*, 1964). Nos anos seguintes, *Aedes apicoargenteus*, *A. opok*, *A. luteocephalus*, *A. vittatus*, *A. furcifer* e *A. aegyti formosus* coletados em pontos da África subsaariana também apresentavam o vírus (Diagne *et al.*, 2015; Diallo *et al.*, 2014). A aquisição do vírus por vetores urbanos e antropofílicos, tais como o *Aedes aegypti* (Marchette *et al.*, 1969), responsáveis pelo ciclo urbano de transmissão ao homem do DENV, por exemplo, desempenhou papel crucial para disseminação rápida e grande número de casos reportados de infecção pelo ZIKV em grandes centros urbanos e capitais no Brasil e no mundo (Ioos *et al.*, 2014).

O ZIKV possui dois ciclos distintos de transmissão: um ciclo de enzootia silvática, no qual

vírus é transmitido para primatas não-humanos através da picada de mosquitos selvagens do gênero *Aedes*; no segundo ciclo, a passagem do vírus ocorre de mosquitos urbanos, para humanos, em zonas urbanas (Weaver *et al.*, 2016; Duffy *et al.*, 2009). Estudos sorológicos indicam a presença de anticorpos contra o ZIKV em mamíferos e alguns roedores, mas não se sabe ao certo se estes desenvolvem doença ou se atuam apenas como reservatórios do vírus na natureza (Ioos *et al.*, 2014).

A infecção pelo ZIKV se inicia após o inóculo no hospedeiro pela picada de um mosquito vetor. O seu período de incubação é semelhante ao do DENV, variando de 4 a 5 dias (Duffy *et al.*, 2009). Os sinais e sintomas clássicos associados à infecção são: febre, artralgia, *rash* cutânea, dor retro orbital e conjuntivite (Brasil *et al.*, 2016; Duffy *et al.*, 2009; Macnamara, 1954). No entanto, podem ser observadas complicações associadas ao ZIKV, como: aborto, microcefalia e má-formações neurológicas em recém-nascidos, além de diferentes neuropatias em adultos, como a Síndrome de Guillain-Barré (ECDC, 2014; Oehler, *et al.*, 2014).

A patogênese do ZIKV ainda não foi totalmente elucidada (Wang *et al.*, 2016). Uma característica dos flavivírus também observada no ZIKV é a infecção de fibroblastos da derme, queratinócitos da epiderme e células dendríticas imaturas, próximas ao local da picada do vetor (Hamel *et al.*, 2015). O vírus replica inicialmente nestas células, devido à susceptibilidade e permissividade destas (Briant *et al.*, 2014). A infecção de fibroblastos da pele leva formação de autofagossomos e autofagia celular, propiciando uma replicação viral exacerbada (Zanluca e Santos, 2016; Hamel *et al.*, 2015). Posteriormente, o vírus atinge a corrente sanguínea, gerando uma viremia primária e, uma vez no sangue, o vírus pode se disseminar pelo corpo e infectar diferentes órgãos. O RNA do ZIKV já foi detectado em baço, cérebro, fígado, olho e placenta, indicando pantropismo viral (Bhatnagar *et al.*, 2017; Waldorf *et al.*, 2016). Sabe-se que o vírus possui afinidade por receptores celulares, como o DC-SIGN, e membros da família de receptores de fosfatidil serina: Tyro3, TIM-1, TIM-4 e AXL (Hamel *et al.*, 2015; Perera-Lecoin *et al.*, 2013). Os receptores Tyro3, AXL e Merk, denominados em conjunto como receptores TAM, são os receptores mais cogitados para a entrada do ZIKV nas células humanas, porém, paradoxalmente, em modelo murino, utilizando anticorpos bloqueadores para estes receptores, foi descrito que os receptores TAM não são essenciais para a entrada do vírus em células de camundongo (Hastings *et al.*, 2017). O receptor AXL é altamente expresso em células endoteliais, da glia radial, astrócitos, micróglia (durante o desenvolvimento do córtex cerebral humano) e por células

progenitoras da retina. Uma vez que o RNA do ZIKV já foi obtido de amostras de olho e cérebro, além de o vírus estar relacionado com o desenvolvimento de complicações neurológicas em neonatos e adultos, este receptor pode ter papel fundamental no tropismo do ZIKV por tecidos neuronais e olhos (Bhatnagar *et al.*, 2017; Nowakowski *et al.*, 2016). Em adição, o ZIKV consegue estabelecer infecção persistente nas células de Sertoli, nos túbulos seminíferos, e esta característica está relacionada ao isolamento e viabilidade do ZIKV no sêmen, mesmo meses após o clearance viral, possibilitando a transmissão sexual do vírus (Siemann *et al.*, 2017). Devido ao seu pantropismo, o ZIKV pode ser encontrado em diferentes fluídos corporais, tais como urina, saliva, lágrimas, além de sangue e sêmen. (Brasil Martines *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Gourinat *et al.*, 2015; Musso *et al.*, 2015). Assim, sua transmissão ocorre, além da picada de mosquitos infectados (Boorman e Porterfield, 1956), por transfusão de sangue, da mãe para o feto durante a gestação e amamentação (Brasil *et al.*, 2016), como também por contato sexual (Atkinson *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

1.3 Resposta imunitária contra ZIKV

Os mecanismos de resistência e evasão viral utilizados durante a infecção pelo ZIKV ainda não foram completamente elucidados, bem como as vias de sinalização desencadeadas pela resposta imune antiviral contra o vírus (Hamel *et al.*, 2015).

Trabalhos anteriores, descritos na literatura, indicam que a infecção pelo ZIKV induz uma robusta resposta imune inata do hospedeiro a partir da infecção de células presentes no sítio da infecção ou adjacentes a este. Foi observado que após a infecção ocorre um aumento da expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) moleculares associados a patógenos (PAMPs) virais, tais como RIG-I, TLR3 e MDA5. Isso resulta na produção de interferon do tipo I, e consequentemente na indução do estado antiviral das células adjacentes, com produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como CCL5 e CCL10, inibição da síntese proteica e indução de morte celular. Alguns artigos indicaram também um aumento da transcrição de genes de componentes envolvidos na ativação de inflamossomo, como AIM2 e IL-1 β (Hamel *et al.*, 2015). Na infecção pelo ZIKV, ocorre a formação de autofagossomos em fibroblastos da pele associado a um aumento da replicação viral nessas células (Hamel *et al.*, 2015).

Genes estimulados por interferon têm sua expressão aumentada durante a infecção pelo

ZIKV. A produção e reconhecimento de interferon do tipo I e III induz atividade antiviral nas células do hospedeiro e são capazes de inibir significativamente a replicação viral durante a infecção (Hamel *et al.*, 2015). O ZIKV é capaz de evadir a resposta de interferon do tipo I gerada em hospedeiros humanos (Winkler *et al.*, 2017). A proteína NS5 do ZIKV inibe a função sinalizadora de STAT2, marcando a proteína para degradação via proteassoma, suprimindo a atividade antiviral *downstream* promovida pela sinalização via interferon, possibilitando a replicação viral. Todavia, a atividade inibitória de STAT2 por NS5 não é observada em modelo murino. Desta forma, camundongos selvagens conseguem controlar a infecção (Grant *et al.*, 2016).

A infecção pelo ZIKV é responsável por induzir a expressão das quimiocinas CCL5, IP-10 e RANTES; produção e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e MIP1 α , como também das citocinas co-estimulatórias IL-2, IL-4, IL-9 e IL-17, responsáveis por promover a ativação de linfócitos T durante a apresentação de antígeno por células especializadas, tais como as células dendríticas (Hamel *et al.*, 2015; Tappe *et al.*, 2016; Zammarchi *et al.*, 2015). Células dendríticas são responsáveis pela detecção, endocitose e processamento de um patógeno, interligando a resposta imune inata e a adaptativa (Schmid e Harris, 2014). Estudos confirmam que células dendríticas são susceptíveis à infecção e replicação de diversos flavivírus como o DENV e WNV (Perera-Lecoin *et al.*, 2014). De acordo Bowen *et al.*, isolados das linhagens africana e asiática do ZIKV apesar de serem capazes de estabelecer uma infecção produtiva em células dendríticas, estes, não geram um aumento significativo da produção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de marcadores de ativação. Dessa forma, células dendríticas têm a sua capacidade de apresentação e ativação de células da imunidade adaptativa comprometida durante a infecção, por ambas as linhagens, do ZIKV (Bowen *et al.*, 2017).

O papel desempenhado por linfócitos T durante a infecção pelo ZIKV ainda não está completamente esclarecido. Células T CD8⁺ são células essenciais no controle de infecções virais, e dados recentes na literatura confirmam o papel dos linfócitos T CD8⁺ contra o ZIKV, bem como para outros flavivírus (Lima *et al.*, 2017). Essas células participam do controle e proteção contra a infecção pelo DENV (Screaton *et al.*, 2015; Zellweger e Shrestha, 2014; Yauch *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2000). A imunidade mediada pelos linfócitos T CD8⁺ é importante para o *clearance* viral em infecções por flavivírus neuroinvasivos, como o WNV (Hughes *et al.*, 2012; Shrestha e Diamond, 2004), e um estudo em primatas não-humanos mostrou que o controle

e diminuição da carga viral no sistema nervoso central dos animais, durante infecção persistente pelo ZIKV, está associado ao início da resposta imune adaptativa celular, cerca de oito dias após infecção, caracterizado pelo aumento dessas células na corrente sanguínea dos animais (Aid *et al.*, 2017). A infecção pelo ZIKV é capaz de induzir a proliferação e ativação de linfócitos T CD8⁺ em camundongos, o mesmo não foi observado em camundongos fêmeas grávidas, o que sugere a importância desse tipo celular no controle da disseminação do vírus para o feto e anexos embrionários (Winkler *et al.*, 2017). Elong Ngono *et al.* descreveram também o papel protetor de linfócitos T CD8⁺ em modelo murino, uma vez que após depleção destas células *in vivo*, foi observado um aumento da carga viral e da letalidade nos animais infectados. Além disso, foi demonstrado que a transferência adotiva do compartimento de memória de células T CD8⁺ previamente estimuladas com o vírus, são capazes de conferir proteção no modelo de infecção letal de ZIKV (Elong Ngono *et al.*, 2016). Por outro lado, o papel protetor de linfócitos T CD8⁺ em infecção primária pelo DENV pode ser revertido em uma infecção secundária por outro sorotipo de DENV, a partir da fraca reativação de linfócitos T CD8⁺ de memória, baixos níveis de degranulação celular e produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, o que pode favorecer a ocorrência de quadros mais severos da doença (Weiskopf *et al.*, 2013; Zivna *et al.*, 2002). Além disso, uma resposta robusta por parte dos linfócitos T CD8⁺ pode estar associada a processos autoimunes, como o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré e com a síndrome congênita do ZIKV em fetos, devido ao fato de a resposta imune induzida pelo ZIKV possivelmente apresentar reatividade cruzada com antígenos presentes em tecidos nervosos do hospedeiro (Lucchese e Kanduc, 2016). Em estudo recente, Jurado *et al.* descreveram em modelo murino imunodeficiente (*Ifnar1*^{-/-}) que a neuropatogênese da infecção pelo ZIKV desencadeia um papel patogênico de linfócitos T CD8⁺ para a progressão da doença. A infecção de astrócitos resulta na ruptura da barreira hematoencefálica que, conseqüentemente, gera a migração em massa de células T CD8⁺ efetoras para o cérebro dos animais. Com isso, os camundongos infectados desenvolveram como neuropatologia, mediada por linfócitos T CD8⁺, a paralisia associada ao ZIKV (Jurado *et al.*, 2017).

Linfócitos T CD4⁺ são células centrais na ativação e na manutenção da resposta de linfócitos T CD8⁺ e células B e na produção de citocinas inflamatórias, como IFN γ , durante infecções virais (Lima *et al.*, 2017; Sitati e Diamond, 2006). Essas células são essenciais para o *clearance* viral do DENV (Yauch *et al.*, 2010). Em modelo murino infectado com WNV, a

depleção de linfócitos T CD4⁺ implicou na diminuição de produção de IgG e ativação linfócitos T CD8⁺. Em adição, a infecção pelo ZIKV induz o fenótipo Th1 em linfócitos T CD4⁺, levando à produção de altos níveis de IL-2, IFN γ e TNF α , em camundongos C57BL/6 (Pardy et al., 2017) e, em amostra de pacientes com histórico de infecção pelo ZIKV, linfócitos T CD4⁺ de memória específicos contra o ZIKV faziam parte do repertório CXCR3⁺ Th1 (Stettler *et al.*, 2016). Por outro lado, Cimini *et al.* descreveram, a partir de análises por citometria de fluxo de amostras clínicas de pacientes em fase aguda da infecção pelo ZIKV, que há redução significativa do número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN γ circulantes em pacientes com ZIKV quando comparados com pacientes em fase aguda de infecção pelo DENV (Cimini *et al.*, 2017). Então, ainda que estudos demonstrem semelhanças no perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ entre a infecção causada por diferentes flavivírus, o papel dessas células durante a infecção pelo ZIKV e demais flavivírus ainda precisa ser mais investigado.

Apesar de um papel essencial descrito pela resposta humoral no controle da infecção pelo ZIKV, poucos dados relacionados às células B no contexto da infecção estão disponíveis na literatura. Silveira *et al.* descreveram em modelo animal, utilizando macacos rhesus, o aumento do número de células B circulantes três dias após infecção, e que os níveis de células B ativadas e células B de memória permanecem alterados e constantes até o septuagésimo dia após infecção. O aumento do número de total de plasmablastos circulantes, por sua vez, é alterado somente a partir do quinto dia após infecção, associado a um aumento do título de IgM e IgG específicos contra a NS1 do ZIKV (Silveira *et al.*, 2017). Uma resposta humoral eficaz contra o ZIKV é mediada por anticorpos neutralizantes, produzidos a partir da ativação dessas células. O alto nível de identidade entre as cepas do ZIKV, de aproximadamente 99%, sugere que o soro do hospedeiro seja capaz de protegê-lo de uma infecção secundária heterotípica do ZIKV, diferentemente da proteção humoral contra uma infecção secundária de DENV em um hospedeiro previamente infectado por outro sorotipo do vírus (Sumathy *et al.*, 2017). O ZIKV compartilha epítomos conservados com outros flavivírus, e a infecção primária é capaz de proteger e aumentar a resposta do hospedeiro contra uma infecção por DENV, por exemplo (Grifoni *et al.*, 2017). Todavia, ainda é controverso se a reatividade cruzada de soro imune específico contra o DENV com o ZIKV é capaz de desencadear o processo de ADE (sigla inglesa para *antibody-dependent enhancement*), que favorece a entrada do vírus nas células susceptíveis, aumentando o risco de ocorrência de quadros mais severos da doença, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bardina *et al.*, 2017;

Dejnirattisai *et al.*, 2016). Anticorpos monoclonais, pertencentes ao isotipo IgG1, específicos para diversos epítomos, principalmente àqueles específicos contra o domínio III (EDIII), da proteína de envelope do ZIKV apresentam atividade neutralizante *in vitro*. Ensaio *in vivo* com imunização passiva de camundongos C57BL/6 com anticorpos monoclonais contra EDIII preveniu a infecção dos animais, e a imunização passiva de fêmeas grávidas imunocomprometidas (Ifnar1^{-/-}) com os mesmos anticorpos monoclonais foi capaz de diminuir a letalidade dos fetos (Sapparapu *et al.*, 2016).

1.4 Modelos murinos experimentais para estudo do ZIKV

A necessidade de compreender mais sobre a patogênese da infecção pelo ZIKV requer o desenvolvimento de modelos animais susceptíveis à infecção. Diversos modelos experimentais *in vivo* já foram descritos para o estudo da patogênese da infecção de outros flavivírus. Modelos animais utilizando camundongos A129 (deficiente para o receptor de interferon do tipo I, α/β) e AG129 (deficiente para os receptores de interferon do tipo I e II, $\alpha/\beta/\gamma$), por exemplo, são amplamente utilizados para o estudo de infecção pelo DENV (Zellweger *et al.*, 2015; Prestwood *et al.*, 2012; Yauch *et al.*, 2010), da mesma forma que camundongos C57BL/6 CD4^{-/-} e camundongos C57BL/6 MHC de classe II^{-/-} são modelos experimentais susceptíveis à infecção subcutânea por WNV (Sitati e Diamond, 2006). Portanto, a partir disso, diversos grupos científicos vêm estabelecendo a infecção *in vivo* do ZIKV, a fim de avaliar e compreender os padrões de resposta imune inata e adaptativa gerados a partir da infecção.

Camundongos C57BL/6 e BALB/c selvagens não desenvolvem sinais indicativos de doença e não sucumbem à infecção por cepas das linhagens africana e asiática do ZIKV, incluindo isolado da Polinésia Francesa, Brasil e Porto Rico (Morrison e Diamond, 2017). A infecção pelo ZIKV induz a proliferação de linfócitos T CD4⁺ em camundongos, porém não leva ao aumento da expressão de marcadores de ativação. Os níveis de linfócitos T CD4⁺ *helper* e T reguladoras (Foxp3⁺) não variam durante a infecção pelo ZIKV em animais C57BL/6 selvagens (Winkler *et al.*, 2017). Animais C57BL/6 selvagens, que sofreram depletação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não perdem peso de forma significativa quando infectados (Winkler *et al.*, 2017). Em contraste, o fenótipo resistente de camundongos imunocompetentes também pode ser associado à idade

destes no momento do inóculo do vírus. Camundongos selvagens de 35 dias de vida, que sofreram inóculo intracraniano da cepa africana do ZIKV MR766, sucumbem à infecção, apresentando sinais de morbidade desde o quinto dia após inóculo (Boorman e Porterfield, 1956). Duggal *et al.* descreveram em modelo murino imunocompetente, com camundongos CD-1/ICR, comparando a dose dos inóculos das cepas africana (MR766) e asiáticas (DakArd41524 e PRVABC59) variando de 10^1 a 10^6 PFU, que sinais de morbidade e mortalidade variam quando a idade dos camundongos também varia. Animais de 4, 8 e 12 semanas morrem após o inóculo intracraniano da cepa africana, mas não aqueles infectados com a cepa asiática PRVABC59. Contudo, a cepa asiática DakArd41524 foi responsável pela morte de mais de 20% dos camundongos de quatro semanas (Duggal *et al.*, 2017).

Sabendo que a supressão da resposta antiviral contra o ZIKV é necessária para o estabelecimento da infecção em humanos, o uso de camundongos imunodeficientes permite o estabelecimento de infecção primária do ZIKV em murinos, uma vez que a resposta a interferon do tipo I é capaz de controlar a infecção nestes animais (Lazear *et al.*, 2016, Tripathi *et al.*, 2017, Winkler *et al.*, 2017). Quando camundongos C57BL/6 selvagens são tratados com anticorpos anti-Infar1, desenvolvem viremia, mas não doença associada à infecção pelo ZIKV (Lazear *et al.*, 2016). Por outro lado, animais deficientes para o gene *Infar1* (gene codificante para o receptor de interferon do tipo I) desenvolvem doença. Animais C57BL/6 deficiente para STAT2, como também o triplo knockout *Irf3^{-/-} Irf5^{-/-} Irf7^{-/-}*, por sua vez, são susceptíveis e desenvolvem doença severa a partir da infecção subcutânea de cepas das linhagens africana e asiática do ZIKV (Morrison e Diamond, 2017; Tripathi *et al.*, 2017).

O modelo murino utilizando animais C57BL/6 H-2^b (camundongos que foram tratados com anticorpos anti-IFNAR) e animais C57BL/6 LysMCre+ IFNAR^{fl/fl} (camundongos que não expressam o receptor de interferon do tipo I em células mielóides) demonstrou a susceptibilidade do modelo à infecção pelo ZIKV, comparando duas cepas de linhagens distintas do ZIKV (uma africana e uma asiática). Foi observado nestes animais que linfócitos T CD8⁺ assumem fenótipo polifuncional e citotóxico na infecção, e demonstram que camundongos deficiente para células T CD8⁺ tiveram alta taxa de mortalidade frente à infecção (Elong Ngonu *et al.*, 2016). Camundongos C57BL/6 deficiente para *Rag1* (gene codificante para proteína envolvida na ativação de recombinação somática), os quais possuem respostas adaptativa celular e humoral deficientes, após supressão da resposta de interferon do tipo I, através do tratamento destes com

anticorpo específico, quando infectados com a cepa africana do ZIKV, desenvolveram doença severa, com manifestações no Sistema Nervoso Central e camundongos C57BL/6 *deficiente* para Mavs (proteína adaptadora *downstream* a RIG-I na via de sinalização por interferon), que sofreram depleção de linfócitos T CD4+ e T CD8+, perdem peso de forma significativa durante a infecção pelo ZIKV (Winkler *et al.*, 2017).

Em outros modelos experimentais de infecção de ZIKV, a letalidade da infecção ocorre, e é mais evidente, em animais de menor idade. A letalidade da infecção de camundongos A129, a partir do inóculo de $1,0 \times 10^4$ PFU por via subcutânea, por uma cepa do ZIKV isolada no Camboja, variou de acordo com a idade dos animais, sendo que 100% dos animais de três semanas, 50% dos animais de cinco semanas e 0% dos animais de onze semanas sucumbiram à infecção (Rossi *et al.*, 2016). Já camundongos AG129 sucumbem à infecção pelo ZIKV independentemente da idade ou dose do inóculo viral (≥ 1 PFU) (Aliota *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2016).

Em um panorama geral, o desenvolvimento de modelos murinos imunodeficientes, e que sejam susceptíveis à infecção por ZIKV, permite a observação de uma viremia significativa, carga viral em tecidos infectados e morte dos animais decorrente da infecção, a partir do inóculo de diferentes cepas do ZIKV por diversas vias, como subcutânea, intradérmica, intravenosa, intravaginal e intraperitônea, e de acordo com a idade do animal durante a infecção (Lazer *et al.*, 2016; Tripathi *et al.*, 2017; Duggal *et al.*, 2017).

1.5 Prevenção e tratamento

Ainda não existe uma vacina comercial disponível para prevenção do ZIKV (CDC, 2016). Algumas vacinas, baseadas em diferentes estratégias (DNA, RNAm ou vírus inativado), embora tenham sido aprovadas extraordinariamente para teste pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), já estão sendo estudadas em humanos voluntários (Gruber e Krause, 2017; Larocca *et al.*, 2016; Inovio, 2016). No entanto, há dificuldade de se inferir tanto se a exposição a outros flavivírus pode afetar a resposta imune do indivíduo imunizado, quanto se a progressão para a doença pode de alguma forma ser intensificada. Desde modo, torna-se ainda incerta a aquisição rápida de uma vacina eficaz contra o ZIKV (Pulendran *et al.*, 2013).

Não existe um tratamento específico para os indivíduos infectados pelo ZIKV. Geralmente, o tratamento dos pacientes acometidos é direcionado às manifestações clínicas

desenvolvidas. Em suma, os sintomas mais comuns relatados associados à infecção são tratados com paracetamol ou dipirona, para controle da febre e dores pontuais, de cabeça e nas articulações e anti-histamínicos são indicados caso ocorra desenvolvido de *rash* cutânea com prurido. Assim como na infecção por DENV, a administração de fármaco anti-inflamatório e aspirina não é aconselhável, uma vez que há aumento de chance de desenvolvimento de complicações hemorrágicas (PAHO, 2016; Zanluca e Santos, 2016).

Alguns compostos como Sofosbuvir, análogo nucleosídico terminador de cadeia, Cloroquina, agente bloqueador de endocitose, e Duramicina, inibidor do receptor TIM1, demonstram ação antiviral e são potenciais drogas para prevenção e tratamento, já aprovadas pelo FDA, que poderão ser comercializadas para uso contra o ZIKV em um futuro próximo (Sacramento *et al.*, 2017; Delvecchio *et al.*, 2016; Richard *et al.*, 2015). A habilitação da administração segura desses compostos em gestantes infectadas é fundamental para diminuição de casos de complicações neurológicas e microcefalia em neonatos (Singh *et al.*, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar do intenso e grande avanço nos estudos do ZIKV, pouco ainda se conhece sobre a resposta imune gerada frente à infecção pelo vírus, além de quais mecanismos de defesa são induzidos no hospedeiro e quais componentes do sistema imune estão associados a uma resposta protetora. O entendimento pleno destes parâmetros são importantes para a compreensão da biologia viral e patogênese, bem como para geração de medidas profiláticas eficientes.

Para isso, avaliamos a susceptibilidade de camundongos A129 frente a infecção por diferentes linhagens do ZIKV, assim como a ativação e modulação fenotípica de subpopulações de linfócitos T desencadeadas pela infecção. Uma vez claramente descrita a importância da resposta imune inata no controle da infecção, e o principal modelo murino se baseia na utilização de camundongos imunodeficientes, deficiente para o gene do receptor de IFN do tipo I. Neste trabalho, também avaliamos a importância de diferentes componentes da resposta imune adaptativa no controle da infecção e progressão da doença.

Tendo em vista divergências genéticas e moleculares das linhagens do ZIKV já descritas, comparamos a resposta imune adaptativa induzida frente a duas cepas virais representantes das linhagens africana e asiática do ZIKV: a cepa histórica MR766 e a cepa contemporânea PE243, obtida de isolado clínico de um paciente que reportou caso de febre branda, em Pernambuco, durante a epidemia de ZIKV em 2015, respectivamente.

Desta forma, tendo em vista quais elementos do sistema imune do hospedeiro estão envolvidos na geração de uma resposta antiviral protetora contra o ZIKV, estaremos mais próximos do desenvolvimento e aquisição de medidas profiláticas eficientes; uma vez que dados de morbidade e mortalidade da última epidemia influenciaram negativamente a qualidade de vida da população e economia de alguns países, além de marcar uma geração de crianças que necessitarão de assistência médica durante toda a vida, devido ao desenvolvimento de complicações neurológicas causadas pelo ZIKV. Visto que a epidemia de ZIKV pode ressurgir, diversos países atualmente são considerados como grupos de risco para novas epidemias, os vírus circulantes apresentam elevada taxa de mutação, como a substituição de serina em asparagina na posição 139 (S139N), da proteína precursora de

membrana, que resultou em maior incidência de microcefalia associada à infecção pelo ZIKV, adventos profiláticos são de extrema necessidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Ojetivo geral

Avaliar diferentes componentes da resposta imune adaptativa no controle da infecção e progressão da doença decorrente da infecção por linhagens diferentes de ZIKV em modelo experimental murino.

3.2 Objetivos específicos

1. Validar a susceptibilidade do modelo experimental à infecção pelo ZIKV com as cepas MR766 e PE243;
 - 1.1 Avaliar sobrevida e variação de peso de animais A129 infectados pelo ZIKV;
 - 1.2 Avaliar a cinética de carga viral em diferentes órgãos de camundongos A129 durante a infecção pelo ZIKV;
2. Investigar a produção de IFN γ e o perfil fenotípico adquirido por subpopulações de linfócitos T de camundongos A129 durante a infecção pelo ZIKV;
3. Avaliar a letalidade após desafio com a cepa africana MR766 a partir de transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ produtoras de IFN γ derivados de camundongos previamente infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV;
4. Avaliar a importância de IFN γ no controle da infecção após desafio com a cepa MR766 do ZIKV em camundongos AG129.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparações celulares

Células C6/36 (linhagem celular oriunda de mosquito da espécie *Aedes albopictus*) que foram utilizadas para a propagação das cepas de ZIKV utilizadas neste estudo, foram crescidas em meio L-15 (*Life Technologies*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10% de triptose fosfato, 0.75% de bicarbonato de sódio e 0.2% L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 28°C. Células Vero (linhagem celular isolada de epitélio de rim de macaco verde africano), que foram utilizadas para a titulação viral, foram crescidas em meio DMEM suplementado com L- glutamina e 5% de SFB à 37°C, com atmosfera 5% de CO₂. Procedimento descrito por Coelho *et al.*, 2017.

Esplenócitos totais foram obtidos após sacrifício dos animais A129, AG129 e WT129 dos grupos ZIKV^{MR766}, ZIKV^{BR} e Controle Não-Infectado (Controle N.I.), por inalação de dióxido de carbono (CO₂), cinco dias pós infecção. Os baços dos camundongos foram retirados assepticamente, passados para uma placa de doze poços e macerados individualmente, com auxílio de êmbolo de seringa descartável de 5mL, em 1mL de meio RPMI não suplementado. As amostras foram centrifugadas em tubos estéreis de 2mL a 1600 RPM, por cinco minutos. Posteriormente, parte das células foram plaqueadas e estimuladas, conforme será descrito na seção 4.5 deste capítulo para posterior análise.

4.2 ZIKV

Após prévia propagação do vírus em células C6/36, o título viral foi obtido a partir do número de unidades formadoras de plaque (PFU) na cultura de células Vero, as quais foram previamente plaqueada em placa de 24 poços, com concentração de $4,0 \times 10^4$ células por poço, em 1mL por poço de meio L-15 suplementado.

4.2.1 ZIKV^{MR766}

O ZIKV^{MR766} (cepa africana do ZIKV MR766) foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Amilcar Tanuri, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e

cultivado em células C6/36, como descrito anteriormente.

4.2.2 ZIKV^{BR}

O ZIKV^{BR} (cepa asiática PE243 do ZIKV) foi isolado de um paciente apresentando caso febril em Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Essa cepa foi catalogada e neste projeto nos referiremos a esta como PE243.

O ZIKV^{BR} foi igualmente cultivado em células C6/36 seguindo o mesmo procedimento utilizado para o vírus da linhagem africana.

4.3 Animais

Camundongos A129 (deficiente para o receptor de interferon do tipo I, α/β), camundongos AG129 (deficiente para os receptores de interferon do tipo I e II, $\alpha/\beta/\gamma$) e camundongos 129/Sv (selvagem) de quatro semanas de idade, foram obtidos do biotério do Instituto de Microbiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG, UFRJ), Brasil. O Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da UFRJ, aprovou a realização desses experimentos nos animais requisitados para este projeto.

4.4 Inoculação viral

As alíquotas de vírus, tanto a do ZIKV^{MR766}, quanto do ZIKV^{BR}, passaram por diluições seriadas em PBS 1x (do inglês *phosphate buffered saline*) para obtenção de $2,0 \times 10^5$ PFU por mL de suspensão viral. Antes do inóculo, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 100 μ L, por animal, de uma solução anestésica 10% Ketamina 2% Xilasina diluídas em PBS 1x estéril. O vírus foi inoculado por via intravenosa, através do sinus retro-orbital, em um volume total de 200 μ L por animal. Animais que perderam mais de 25% da massa corporal e apresentando sinais indicativos de doença, foram sacrificados e contabilizados como mortos em alguns experimentos.

4.5 Análise da carga viral por PCR em tempo real

- **Baço:** metade do baço de cada camundongo foi separada e repassada para uma placa de doze poços, macerada individualmente com auxílio de êmbolo de seringa descartável de 5mL, em 300 μ L de meio RPMI não suplementado. O produto foi

passado para tubo estéril de 2mL (o volume do produto macerado foi transferido para o novo tubo ajustado de acordo com o peso do órgão, de forma a ser equivalente entre os animais dos diferentes grupos experimentais), com adição de 1mL de TRIzol, para isolamento de RNA das amostras. As amostras foram guardadas a -80°C até o momento de análise. Posteriormente, as amostras serão tratadas com DNase I a fim de evitar contaminação com DNA da amostra. cDNA foi sintetizado utilizando Kit High-Capacity da empresa Life Technologies®, de acordo com o manual do fabricante. O cDNA sintetizado será utilizado para quantificar RNA viral pela técnica de PCR em tempo real através da plataforma StepOnePlus Real-time PCR system da empresa Life Technologies® e reagentes Taqman Master Mix (Life Technologies®), utilizando *primers* específicos para a sequência E, do envelope viral do ZIKV, conforme descrito por Lanciotti *et al.*, 2008. Transcritos de RNA variando de 75.000 (máximo) a 0,75 (mínimo) foram utilizadas para estipular curva padrão estimativa de cópias do genoma. Os valores obtidos foram normalizados a partir da quantificação do gene eucariótico constitutivo GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), para análises posteriores.

- **Cérebro:** O lobo frontal do hemisfério esquerdo do cérebro de cada camundongo foi repassado para uma placa de doze poços e macerado individualmente, com auxílio de êmbolo de seringa descartável de 5mL, em 500µL de meio RPMI não suplementado. O produto foi passado para tubo de 2mL (o volume transferido para o novo tubo será ajustado de acordo com o peso do órgão, de forma a ser equivalente entre os animais dos diferentes grupos experimentais), com adição de 1mL TRIzol. As amostras foram guardadas a -80°C até o momento de análise. A quantificação de RNA viral foi idêntica à metodologia descrita no item “Baço” desta seção.

4.6 Análise da produção de citocinas e análise fenotípica dos esplenócitos totais por citometria de fluxo

Esplenócitos totais foram processados e obtidos como descrito anteriormente, e condicionados individualmente em diferentes grupos (ZIKV^{MR766}, ZIKV^{BR} e Controle N.I.).

Anticorpos monoclonais contra proteínas de camundongos utilizados para a marcação celular e intracelular são mostrados na tabela 1. Para avaliar citocinas intracelulares, os esplenócitos foram estimulados com o uso de 13-acetato de 12-miristato de forbol (20 ng / mL) (Sigma-Aldrich) e ionomicina (4 µg / mL) (Merck Milipore, Billerica, MA) na presença de Brefeldina A 1X (eBioscience, San Diego, CA) a 37 ° C, 5% de CO₂, durante 4 horas. Em seguida, as células foram lavadas, marcadas com anticorpos contra marcadores de superfície durante 30 minutos, e fixado em paraformaldeído a 1% (PFA). Finalmente, as citocinas intracelulares foram marcadas com anticorpos diluídos em tampão de Permeabilização 1X (eBioscience) durante 40 minutos. Aquisição foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) da Plataforma de Imuno-Análises do Instituto de Biofísica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, e os dados foram analisados por usando o software FlowJo vX (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Esplenócitos totais foram processados e obtidos como descrito anteriormente, e condicionados individualmente em diferentes grupos (ZIKV^{MR766}, ZIKV^{BR} e Controle N.I.).

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços, 0,5x10⁶ células por poço, para marcação de superfície e intracelular, conforme descrito no item 4.6 desta seção.

A fim de estabelecer uma análise mais clara do perfil fenotípico, mixes de anticorpos foram elaborados para essa avaliação, conforme plano explicitado na tabela a seguir:

Tabela 1 Misturas de anticorpos que serão utilizados para marcações de superfície e intracelular de esplenócitos. Os fluorocromos aos quais os anticorpos são conjugados e suas concentrações específicas são explicitados.

Mistura 1: Ativação	Mistura 2: Produção de citocinas	Mistura 3: Linfócitos T CD4, CD8 e Foliculares
Anti-mouse CD8 α -APC [1:200] (eBioscience Clone: 53-6.7) Cat# 17-0081-81	Anti-mouse CD8 α -PEcy7 [1:200] (Tonbo biosciences Clone: 53-6.7) Cat# 60-0081-U100	Anti-mouse CD8 α -PEcy7 [1:200] (Tonbo biosciences Clone: 53-6.7) Cat# 60-0081-U100
Anti-mouse CD4-eFluor450 [1:200] (eBioscience Clone: RM4-5) Cat# 48-0042-82	Anti-mouse CD4-eFluor450 [1:200] (eBioscience Clone: RM4-5) Cat# 48-0042-82	Anti-mouse CD4-eFluor450 [1:200] (eBioscience Clone: RM4-5) Cat# 48-0042-82
Anti-mouse CD44-PerCP-Cy5.5 [1:200] (BioLegend Clone: IM7) Cat# 103032	Anti-mouse IFN γ -APC [1:100] (Tonbo biosciences Clone: XMG1.2) Cat# 20-7311-U100	Anti-mouse CD185 (CXCR5)-PE [1:100] (BioLegend Clone: L138D7) Cat# 145503
Anti-mouse CD62L-BV421 [1:200] (BioLegend Clone: MEL-14) Cat# 104436		Anti-mouse IFN γ -APC [1:100] (Tonbo biosciences Clone: XMG1.2) Cat# 20-7311-U100
		Anti-mouse PD-1-BV605 [1:200] (BioLegend Clone: 29F.1A12) Cat# 135219

A aquisição das células positivas e análise das amostras marcadas pelas diferentes misturas foram realizadas conforme descrito no item 4.6 desta seção.

4.7 Marcação com CFSE

Esplenócitos imunes derivados de camundongos A129 doadores, previamente infectados com a cepa asiática do ZIKV PE243, foram marcados usando CFSE (sigla do inglês *Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) a uma concentração final de 5 μ M durante 10 minutos a 37 °C. As células marcadas foram transferidas para animais receptores, e analisadas 3-5 dias após transferência adotiva por citometria de fluxo. Transferências adotivas de linfócitos T CD8 $^{+}$ ($1,0 \times 10^7$ células por animal) e T CD4 $^{+}$ ($4-5,0 \times 10^7$ células por animal) imunes e marcados com CFSE foram feitas em concomitante ao desafio com a cepa MR766 do ZIKV por via i.v.

4.8 Purificação de linfócitos T CD4 $^{+}$

Camundongos infectados com ZIKV foram sacrificados e os baços foram extraídos e homogeneizados, seguidos de lise de eritrócitos com o tampão de lise ACK. Linfócitos T CD4 $^{+}$ foram isoladas por seleção positiva usando *beads* magnéticas (MACS), de acordo com

instruções do fabricante (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, Alemanha). A pureza da células T CD4⁺ foi determinada por citometria de fluxo, e variaram de 90%-96%, entre os experimentos.

4.9 Transferência adotiva

Camundongos doadores A129, infectados, ou não, com a cepa ZIKV PE243, foram sacrificados sete dias após infecção, para extração e purificação de esplenócitos naïves ($5,0 \times 10^7$ / camundongo) e linfócitos T CD4⁺ ($4-5 \times 10^7$ / camundongo). As células foram transferidas por via intravenosa (sinus retro-orbital) em animais A129 ou AG129 receptores, simultaneamente ao desafio com a cepa africana MR766 (A129) ou com a cepa asiática PE243 (AG129) do ZIKV.

4.10 Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo *software* PRISM (versão 6), e representados como média e desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (testes bilaterais).

5. RESULTADOS

5.1 Infecção de camundongos 129 WT com a cepa africana do ZIKV MR766

Uma vez que a proteína NS5 do ZIKV não é capaz de inibir a função sinalizadora de STAT2, e, conseqüentemente, não suprime a atividade antiviral *downstream* promovida pela sinalização via interferon, em camundongos, neste trabalho, inicialmente nós avaliamos a existência/susceptibilidade de camundongos selvagens, frente ao ZIKV. Camundongos 129 WT de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa africana do ZIKV MR766 por via intravenosa. A infecção viral foi determinada através do acompanhamento de peso, sinais indicativos de doença e sobrevivência dos animais por um período de 15 dias desde a infecção (Figura 4A). Os animais infectados com a cepa MR766 do ZIKV e animais não infectados (grupo controle) ganharam peso de forma semelhante durante o período de acompanhamento. Nenhum sinal indicativo de doença, como atrofia das patas traseiras ou desidratação, foi apresentado pelos animais.

A infecção com a cepa africana do ZIKV não foi letal neste modelo, indicando uma resistência de camundongos da linhagem 129 WT frente à infecção por ZIKV por via intravenosa (Figura 4B).

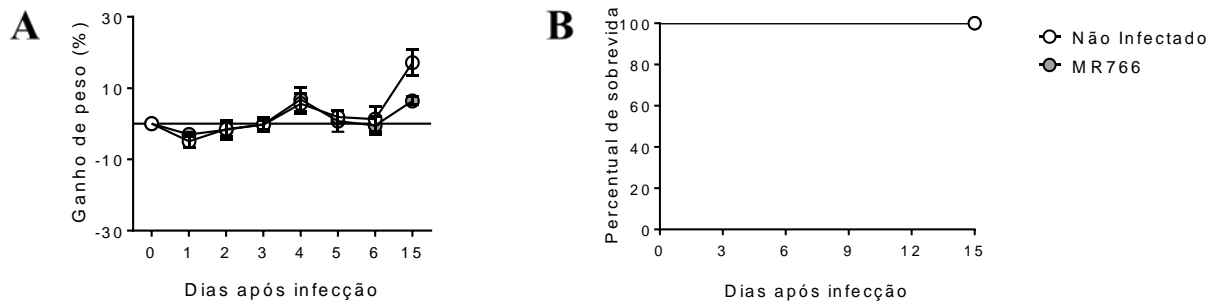


Figura 4 Percentual de ganho de peso e sobrevivência de camundongos 129 WT infectados com a cepa africana do ZIKV MR766. Camundongos 129 WT (n=2 animais no grupo controle não infectado; n=3 animais no grupo infectado com a cepa MR766) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL por via i.v. com a cepa africana do ZIKV MR766. Percentual de ganho de peso (A) e sobrevivência (B) foram acompanhados durante 15 dias após a infecção. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

5.2 Infecção de camundongos A129 com a cepa africana do ZIKV MR766

Dados prévios na literatura indicam que IFN do tipo I é uma resposta inata essencial frente à infecção por ZIKV e que camundongos A129 são susceptíveis à infecção pelo ZIKV. A fim de validar a susceptibilidade dos nossos camundongos A129 à infecção pelo vírus, camundongos de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa africana MR766, por via intravenosa. A percentagem de ganho de massa corporal dos animais foi acompanhada por um período de 15 dias desde a infecção (Figura 5A). Os animais infectados com a cepa do ZIKV MR766 perdem peso rápido e progressivamente durante o curso da infecção.

A infecção com a cepa africana leva à 100% de mortalidade dos animais infectados entre quatro e seis dias após infecção (Figura 5B). Todos os animais apresentaram sinais indicativos de doença, como paralisia das patas traseiras, dificuldade de locomoção, inanição e desidratação antes da morte. A apresentação destes sinais se iniciou cerca de dois dias pós infecção, com agravamento quatro dias após infecção. Animais muito debilitados e com perda de mais de 25% da massa corpórea apresentada no dia 0 de infecção, foram sacrificados e contabilizados como mortos neste ensaio.

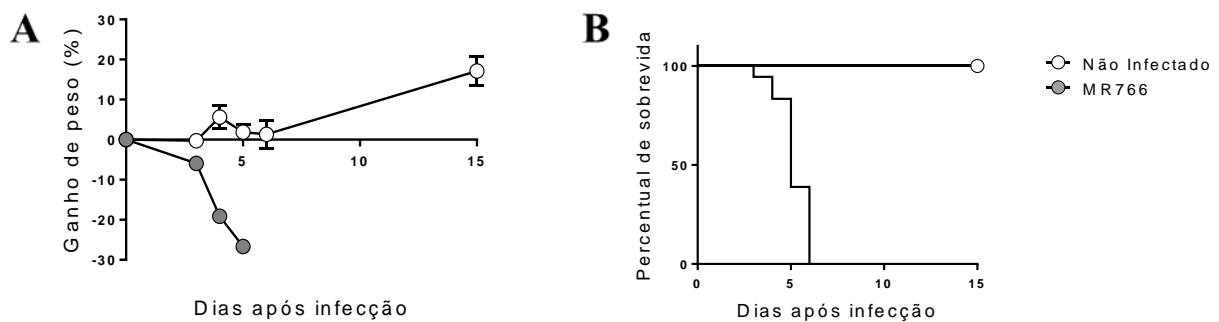


Figura 5 Percentual de ganho de peso e sobrevivência de camundongos A129 infectados com a cepa africana do ZIKV MR766. Camundongos A129 (n=2 animais por grupo) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL por via i.v. com a cepa africana do ZIKV MR766. Percentual de ganho de peso (A) e sobrevivência (B) foram acompanhados durante 15 dias após a infecção. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

5.3 Infecção de camundongos A129 com a cepa asiática do ZIKV PE243

Com finalidade de avaliar comparativamente em nosso modelo, a progressão da infecção por duas linhagens diferentes de ZIKV em camundongos A129, utilizamos também a cepa asiática PE243, isolada a partir de amostra clínica de um paciente em Pernambuco durante a epidemia de ZIKV nas Américas. Após infecção, realizamos o acompanhamento do peso, sinais indicativos de doença e sobrevivência dos animais por um período de 15 dias desde a infecção. Os animais infectados com a cepa africana do ZIKV MR766 não só deixam de ganhar massa corporal como também perdem peso gradativamente durante o curso da infecção (Figura 6A). O mesmo não é observado para animais infectados com a cepa asiática PE243.

Enquanto a infecção com a cepa africana leva a 100% de mortalidade dos camundongos A129 infectados (Figura 6B), os animais infectados com a cepa asiática PE243 sobrevivem à infecção. Parte dos animais infectados com a cepa PE243 apresentaram alguns dos mesmos sinais indicativos de doença apresentados por aqueles infectados com a cepa MR766, como dificuldade de locomoção, de forma mais branda cerca de três dias após infecção, contudo, os camundongos foram capazes de reverter tais manifestações clínicas e não sucumbiram à infecção. Portanto, de acordo com a progressão da infecção apresentada pelos animais infectados com ambas as cepas do ZIKV, constata-se que houve uma diferença de virulência entre as cepas neste modelo de infecção.

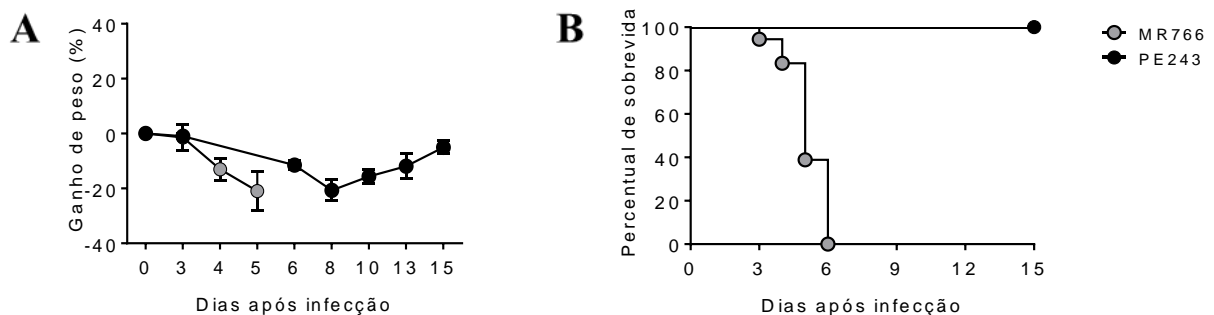


Figura 6 Percentual de ganho de peso e sobrevivência de camundongos A129 infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV. Camundongos A129 (união de dados de experimentos independentes, totalizando n=12 animais por grupo) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL por via i.v. ou com a cepa africana MR766 ou com a cepa asiática PE243 do ZIKV. Percentual de ganho de peso (A) e sobrevivência (B) foram acompanhados durante 15 dias após a infecção. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

5.4 Análise da carga viral em camundongos A129 infectados com cepa africana MR766 vs. camundongos A129 infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV

Dados na literatura confirmam que o Zika é um vírus neurotrópico. Baseados nisso, comparamos a carga viral em amostras de cérebro dos camundongos A129 infectados ou com a cepa africana MR766 ou com a cepa asiática PE243 do ZIKV. Além disso, avaliamos também a carga viral do ZIKV em amostras do baço dos camundongos, uma vez que este órgão reflete o quadro de uma infecção sistêmica. Detectamos altos níveis de RNA viral no baço dos animais após infecção com a cepa PE243, quando comparado com a cepa MR766. Em adição, após infecção com a cepa africana é possível observar elevadas concentrações de RNA viral no cérebro dos camundongos (Figura 7A, B). Dados de ensaio de placa detectaram a presença de partículas infecciosas apenas da cepa MR766 no cérebro dos animais, com pico no sexto dia pós infecção. (Figura 7C).

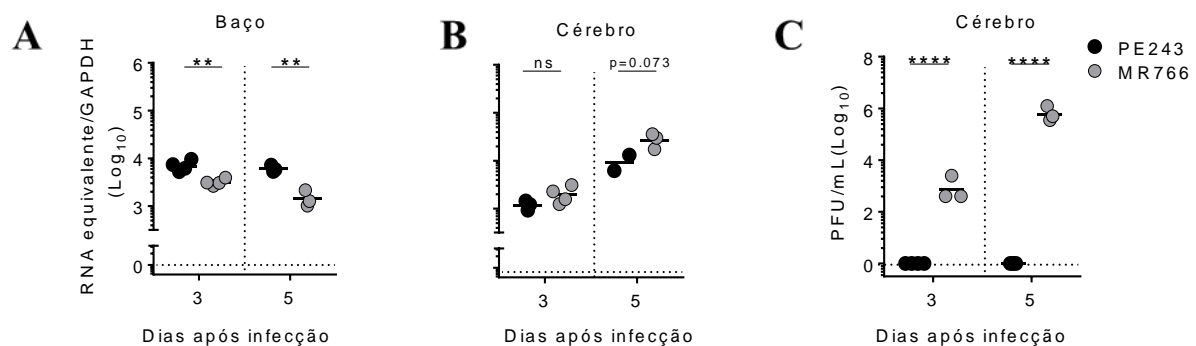


Figura 7 Análise da carga viral do baço e cérebro de camundongos A129 infectados ou com a cepa africana MR766 ou com a cepa asiática PE243 do ZIKV. Camundongos A129 (n=4 animais no grupo infectado com a cepa MR766 no dia 3 após infecção e n=2 no dia 5 após infecção; n=3/4 animais no grupo infectado com a cepa PE243 no dia 3 após infecção e n=3 no dia 5 após infecção) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL das respectivas cepas virais: PE243 e MR766 do ZIKV por via i.v. A presença de RNA viral foi avaliada nos dias 3 e 5 após infecção no baço (A) e cérebro (B) por qRT-PCR e análise de partículas virais infecciosas no cérebro por ensaio de placa (C).

5.5 Análise do perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos T de camundongos A129 infectados com cepa africana MR766 vs. camundongos A129 infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV

Devido a grande diferença observada no curso da infecção de camundongos A129 frente as

diferentes cepas do ZIKV estudadas, em seguida, comparamos modulações induzidas nos compartimentos efetor e de memória de subpopulações de linfócito T, além de variações fenotípicas geradas pela infecção por ZIKV. Para tal, esplenócitos totais foram obtidos cinco dias após infecção de camundongos A129 para análises por citometria de fluxo.

A infecção com a cepa asiática PE243 do ZIKV foi capaz de induzir fenótipo efetor em linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, além de demonstrar maior potencial de ativação de linfócitos T, quando comparada à cepa africana MR766 (Figura 8A-D). Linfócitos T CD8⁺ de animais infectados com a cepa PE243 produzem cerca de três vezes mais IFN γ quando comparados àqueles dos animais infectados com a cepa MR766 ou ao controle não infectado (Figura 8E, F). Padrão semelhante de produção de IFN γ foi observado para com os linfócitos T CD4⁺ (Figura 8G, H). Por conseguinte, a cepa asiática PE243 induz um fenótipo característico de ativação de linfócitos TCD8⁺/TCD4⁺ e maior produção de IFN γ do que a cepa africana MR766 do ZIKV neste modelo.

Sabendo que os linfócitos T CD4⁺ que residem nos folículos de células B são uma subpopulação especializada em promover a maturação das células B em plasmócitos e em células B de memória de longa duração (Miles *et al.*, 2016), investigamos os efeitos da infecção das duas cepas de ZIKV no perfil de ativação e produção de IFN γ para com essas células.

Análises por citometria de fluxo indicaram que a infecção de camundongos A129, de quatro semanas, com a cepa asiática PE243 induziu expansão de linfócitos T CD4⁺ foliculares de forma mais robusta que a infecção com a cepa africana MR766 (Figura 9A, B). A análise de 5 dias após infecção revelou que a infecção com a cepa PE243, além de gerar expansão de linfócitos T CD4⁺ foliculares, induz a produção de IFN γ por estas células (Figura 9C). Assim sendo, a cepa asiática PE243 do ZIKV foi responsável pela ativação de células T, bem como altos níveis de produção de IFN γ , de forma mais potente quando comparada à cepa africana MR766 do ZIKV, neste modelo.

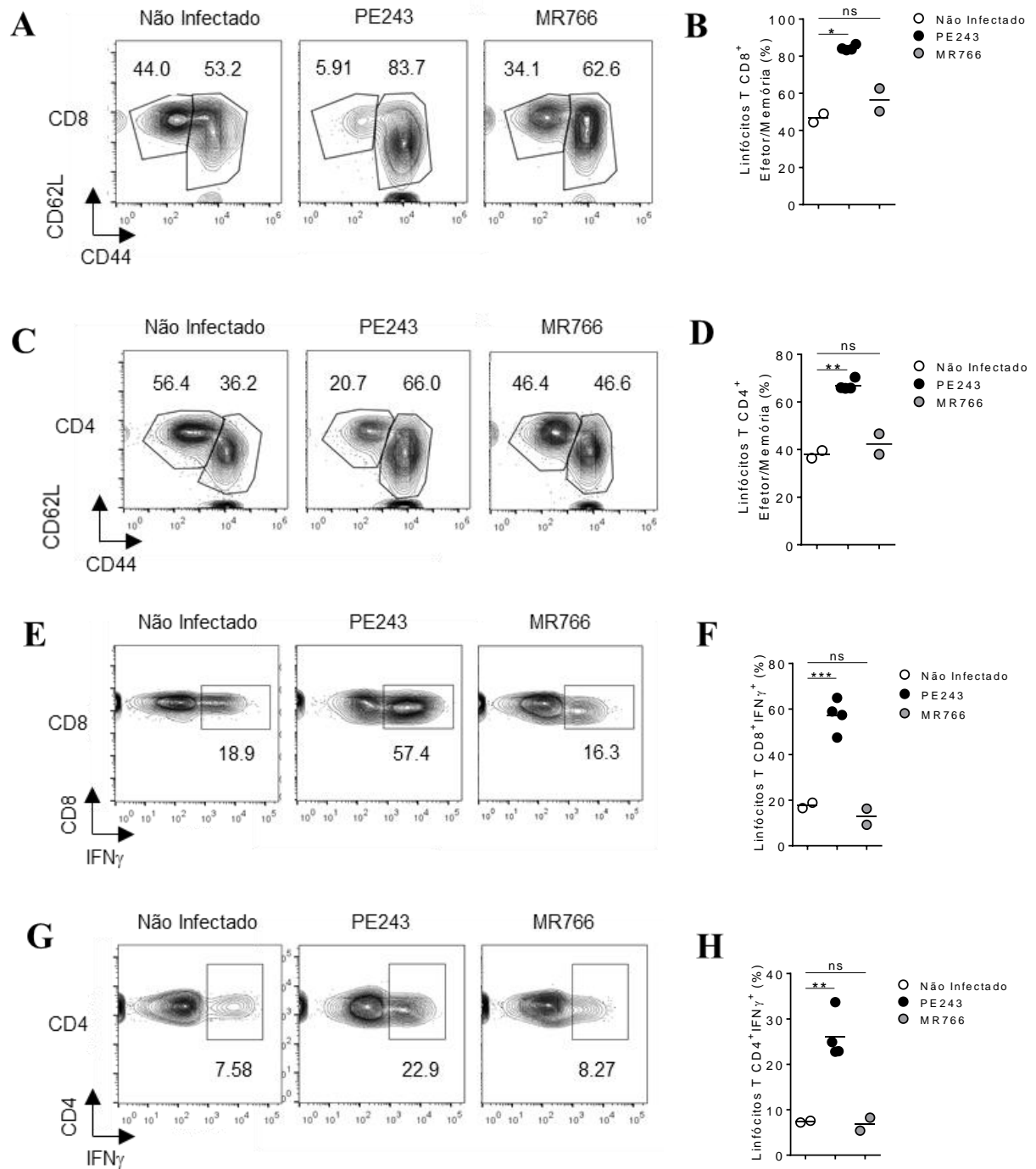


Figura 8 Análise do perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos T de camundongos A129 infectados ou com a cepa africana MR766 ou com a cepa asiática PE243 do ZIKV. Camundongos A129 (n=2 animais no grupo controle não infectado; n=4 animais no grupo infectado com a cepa MR766; n=2 animais no grupo infectado com a cepa PE243) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL das respectivas cepas virais: PE243 e MR766 do ZIKV por via i.v. Os animais foram sacrificados cinco dias após infecção para análises, por citometria de fluxo, dos compartimentos efetor e de memória de linfócitos T CD8+ (A) e T CD4+ (C), a partir da marcação de CD62L e CD44, além da produção de IFN γ por essas respectivas células, a partir da marcação CD8, CD4 IFN γ (E, G). Os gráficos com

número total de células positivas em porcentagem, para sua análise, relacionam as duas cepas de ZIKV (B, D, F e H). Countor plot representativo de um grupo de 2 a 4 camundongos por grupo. Dados estatisticamente analisados pelo teste *t* de Student.

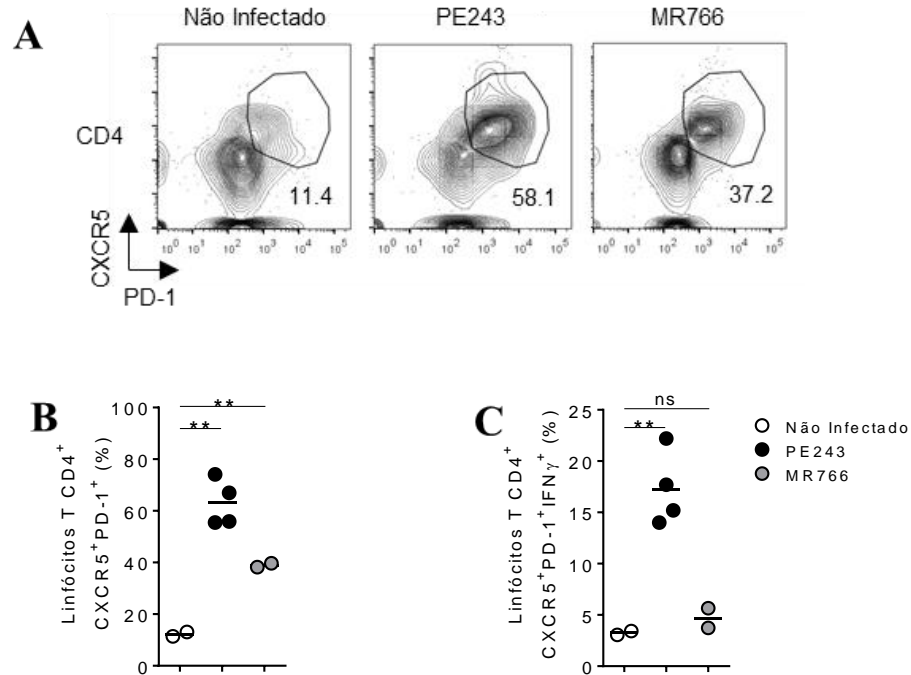


Figura 9 Análise do perfil fenotípico de linfócitos T foliculares de camundongos A129 infectados ou com a cepa africana MR766 ou com a cepa asiática PE243 do ZIKV. Camundongos A129 (n=2 animais no grupo controle não infectado; n=4 animais no grupo infectado com a cepa MR766; n=2 animais no grupo infectado com a cepa PE243) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL das respectivas cepas virais: PE243 e MR766 do ZIKV por via i.v. Os animais foram sacrificados cinco dias após infecção para análises, por citometria de fluxo, do compartimento efetor de linfócitos T CD4⁺ foliculares, partir da marcação de CXCR5 e PD-1, selecionadas no gate de células CD4⁺ (A). Os gráficos com número total de linfócitos T CD4⁺ foliculares e linfócitos T CD4⁺ foliculares produtores de IFN γ , em porcentagem, relacionam as duas cepas de ZIKV (B, C). Countor plot representativo de um grupo de 2 a 4 camundongos por grupo. Dados estatisticamente analisados pelo teste *t* de Student.

5.6 Avaliação do papel protetor da transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243 do ZIKV em camundongos A129 infectados com a cepa MR766

Uma vez que a cepa asiática, PE243, induz uma resposta imune inata mais robusta após infecção em camundongos, posteriormente, com a finalidade de analisar o papel protetor desses esplenócitos totais, foram realizadas transferências adotivas seguidas de desafio letal com a cepa africana em camundongos receptores. Esplenócitos totais imunes (derivados de camundongos

A129 de quatro semanas infectados com a cepa asiática PE243 do ZIKV) e esplenócitos naïves, estes obtidos de camundongos A129 de quatro semanas não infectados foram obtidos sete dias após infecção. Os animais foram sacrificados para extração e purificação dos esplenócitos totais, o procedimento de transferência celular foi realizado pela mesma via de inoculação viral instantes antes de os animais receptores serem desafiados com a cepa letal africana MR766. A transferência adotiva de esplenócitos totais naïves não alterou a progressão da infecção e letalidade da cepa MR766. No entanto, a letalidade da infecção pela a cepa africana é revertida por completo, com ganho de peso progressivo dos animais depois do quarto dia após infecção, a partir da transferência de esplenócitos totais imunes (Figura 10A, B).

A fim de avaliar quais tipos celulares, presentes nos esplenócitos imunes eram responsáveis pelo papel protetor observado, foram realizados experimentos para a observação de proliferação celular *in vivo*. Simultaneamente à infecção com cepa africana, foram realizadas transferências adotivas dos linfócitos T imunes purificados, linfócitos T CD8⁺ ou linfócitos T CD4⁺, em uma ordem de 10^7 células por animal previamente marcados com CFSE. Três dias após infecção, foi possível detectar por análise por citometria de fluxo que, os linfócitos T CD4⁺ apresentaram alta taxa de proliferação, ao passo que os linfócitos T CD8⁺ não proliferaram em mesmo grau. Em adição, apenas os linfócitos T CD4⁺ que proliferaram nos camundongos receptores apresentaram grande produção de IFN γ (Figura 10C).

Interessantemente, a transferência adotiva de linfócitos T CD8⁺ não foi capaz de reverter a letalidade da infecção pela cepa africana MR766 do ZIKV, neste modelo (Figura 10D). Contudo, linfócitos T CD4⁺, imunes derivados de animais infectados com a cepa asiática PE243, quando transferidos para camundongos A129 de quatro semanas desafiados, em concomitante, com a cepa MR766, proliferaram e produzem altos níveis de IFN γ . Portanto, a transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ imunes produtores de IFN γ possibilitou, neste modelo, o controle da infecção pela cepa letal africana MR766.

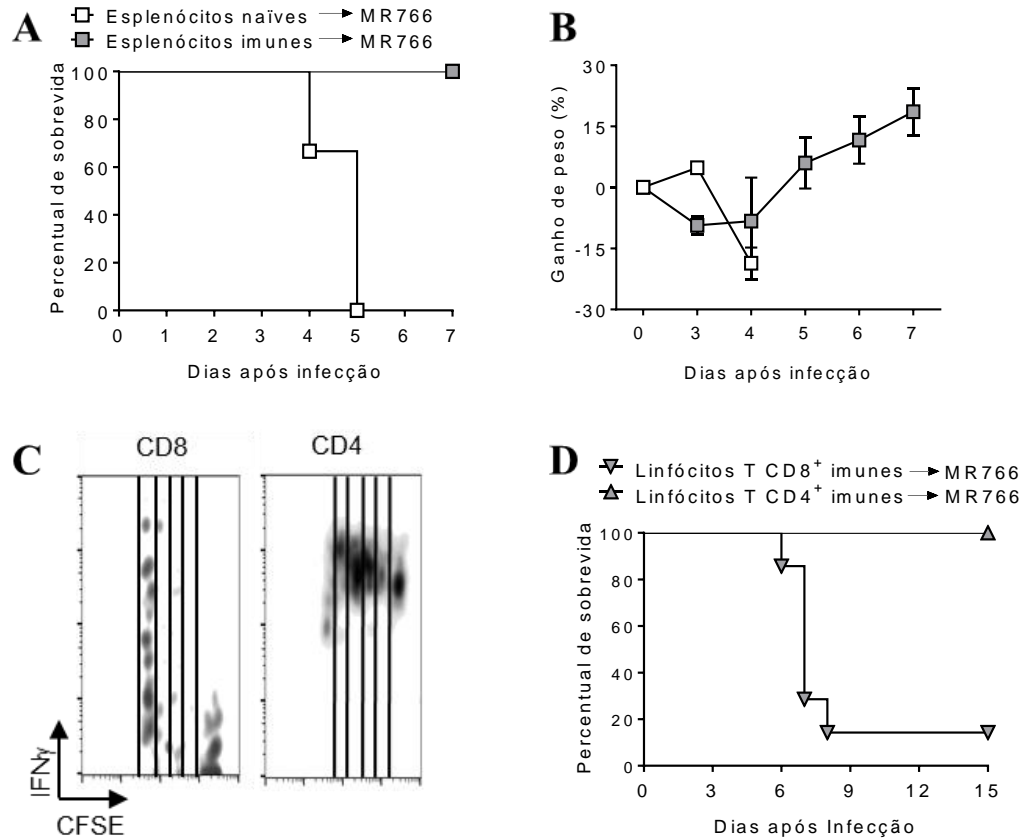


Figura 10 Percentual de ganho de peso e sobrevivência de camundongos A129 infectados com a cepa africana do ZIKV MR766 após transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243. Esplenócitos totais naíves foram obtidos de camundongos A129 (n=5 animais por grupo) de quatro semanas não infectados, e foram transferidos ($5,0 \times 10^7$ células por animal) em concomitante ao desafio com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa MR766 do ZIKV por via i.v. para animais A129 receptores. Esplenócitos totais foram obtidos de camundongos A129 de quatro semanas 7 dias após infecção com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa PE243, e foram transferidos ($5,0 \times 10^7$ células por animal) em concomitante ao desafio com a cepa MR766 do ZIKV por via i.v. Análises por citometria de fluxo foram feitas para avaliar a proliferação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ imunes marcados com CFSE, além da produção de IFN γ por essas respectivas células (C). Transferências adotivas de linfócitos T CD8⁺ ($1,0 \times 10^7$ células por animal) e T CD4⁺ ($4-5,0 \times 10^7$ células por animal) imunes foram feitas em concomitante ao desafio com a cepa MR766 do ZIKV por via i.v., prezando pela transferência de número de células proporcionais à proporção destas no purificado de esplenócitos totais de um baço proveniente de um animal infectado com a cepa PE243 do ZIKV (D).

5.7 Avaliação do papel protetor da transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243 do ZIKV em camundongos AG129 infectados com a cepa MR766

Uma vez que a infecção pela cepa asiática PE243 do ZIKV não é letal para camundongos A129 de quatro semanas, induz a ativação linfócitos T CD4⁺ secretores de IFN γ durante a infecção;

além de purificadas, estas células se mostraram responsáveis pelo controle frente ao desafio letal com a cepa africana MR766, em seguida, buscamos avaliar a importância do IFN γ para com o controle da infecção. Para tal, analisamos o curso da infecção em animais AG129, os quais são deficientes para os genes dos receptores de interferon do tipo I (α/β) e interferon do tipo II (γ), frente as duas cepas virais, africana e asiática. Realizamos ensaios de transferência adotiva de linfócitos T CD4 $^+$ imunes de camundongos A129 para camundongos AG129.

Camundongos AG129 assim como os A129 são susceptíveis à infecção com as cepas asiática PE243 e africana MR766 do ZIKV, no entanto, também observamos letalidade nos animais infectados com a cepa 243, até o sétimo dia após infecção (Figura 11A). A incapacidade do reconhecimento e sinalização do interferon dos tipos I e II pelo animal se mostrou ponto crucial para a letalidade da infecção por ambas as cepas, neste modelo.

O procedimento de obtenção e purificação de linfócitos T CD4 $^+$ de camundongos A129, assim como a transferência adotiva e desafio com a cepa africana, foi o mesmo que o descrito no item 5.7 deste capítulo, no entanto, para camundongos AG129 receptores.

A transferência adotiva de esplenócitos totais, ou linfócitos T CD4 $^+$ imunes de camundongos A129 para camundongos receptores AG129 não foi capaz de prevenir a letalidade da infecção pela cepa africana do ZIKV, neste modelo. Este dado denota papel fundamental do IFN γ no controle da infecção por ZIKV em nosso modelo (Figura 11B).

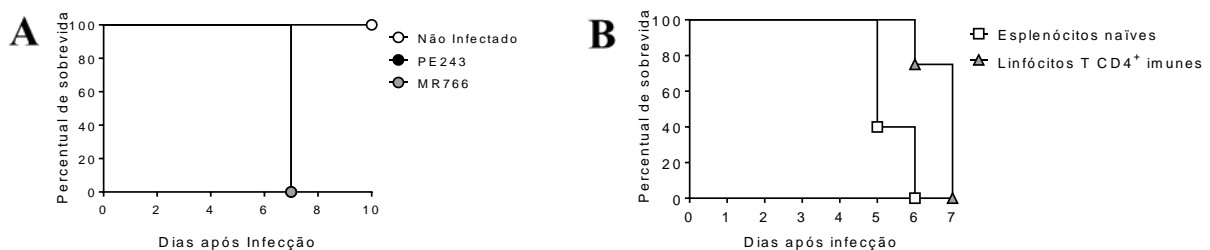


Figura 11 Percentual de ganho de peso e sobrevivência de camundongos AG129 infectados com a cepa africana do ZIKV MR766 após transferência adotiva de linfócitos T CD4 $^+$ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243. Camundongos A129 (n=5 animais por grupo) de quatro semanas foram infectados com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa PE243 ou da cepa MR766 e o percentual de sobrevivência foi acompanhado (A). Esplenócitos totais naïves foram obtidos de camundongos A129 de quatro semanas não infectados, e foram transferidos ($5,0 \times 10^7$ células por animal) em concomitância ao desafio com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa MR766 do ZIKV por via i.v. Linfócitos T CD4 $^+$ imunes foram obtidos de camundongos A129 de quatro semanas 7 dias após infecção com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa PE243, e foram transferidos ($4-5,0 \times 10^7$ células por animal) em concomitância ao desafio com $2,0 \times 10^5$ PFU/mL da cepa MR766 do ZIKV por via i.v. e o percentual de sobrevivência foi acompanhado (B).

8 DISCUSSÃO

Camundongos 129 selvagens de quatro semanas infectados com a cepa africana MR766 do ZIKV são resistentes à infecção e não apresentam sinais indicativos de doença, como paralisia das patas traseiras, dificuldade de locomoção, inanição e desidratação, quando infectados. Este dado corrobora a descrição de Grant *et al.* de que, em camundongos, a proteína NS5 do ZIKV não é capaz marcar STAT2 para degradação via proteassoma, o que permite a atividade antiviral *downstream* promovida pelo reconhecimento de interferon, impossibilitando a replicação viral. Além disso, os nossos dados são compatíveis com os dados descritos no trabalho de Morrison e Diamond, de que camundongos imunocompetentes são resistentes à infecção, sem a ocorrência de sinais indicativos de doença.

Uma vez que camundongos imunocompetentes são resistentes à infecção pelo ZIKV, buscamos explorar modelos susceptíveis à infecção para estudar e compreender a resposta imune ao ZIKV. Sendo assim, utilizando camundongos A129 deficientes da sinalização de IFN γ , observamos que quando são infectados com a cepa MR766 do ZIKV apresentam sinais indicativos de doença, como paralisia das patas traseiras, dificuldade de locomoção, inanição e desidratação, antes de sucumbirem à morte, reproduzindo, desta forma, os dados apresentados por Rossi *et al.* em seu trabalho. A letalidade da cepa MR766 em camundongos A129 está associada com uma baixa ativação de linfócitos T CD8 $^{+}$ e CD4 $^{+}$ e a um maior neurotropismo, característica adquirida após sucessivas passagens do vírus (>100 passagens) em camundongos desde o seu isolamento em 1947 (Dick *et al.*, 1952). De fato, observamos o aumento progressivo da carga viral no cérebro que culminou com óbito dos camundongos. Todavia, a infecção pela cepa asiática PE243 do ZIKV não foi capaz de gerar a mesma progressão da doença ou letalidade em camundongos A129. Esses dados sugerem que a indução da ativação da resposta imune adaptativa é essencial no controle da disseminação viral e previne a morte dos animais após infecção com a cepa asiática do ZIKV. Porém, o mesmo não é observado para outras cepas da linhagem asiática do ZIKV neste modelo. Rossi *et al.* descrevem a letalidade de camundongos A129 a partir infecção de uma cepa asiática do ZIKV, isolada no Camboja, utilizando um inóculo de $1,0 \times 10^4$ PFU por animal, ou seja, dose inferior à utilizada em nosso trabalho ($2,0 \times 10^5$ PFU).

A cepa asiática PE243 foi capaz de induzir a proliferação de linfócitos T CD8 $^{+}$ e T CD4 $^{+}$ com fenótipo efetor e produtor de IFN γ durante infecção de camundongos A129 de quatro semanas de forma mais robusta do que a cepa MR766. Esta ativação da resposta imune adaptativa, associada

a altos níveis de produção de IFN γ por essas células, parece ter sido um dos mecanismos que atuou no controle da infecção. É sabido que o IFN γ é capaz de mediar a ativação de mecanismos efetores da resposta imune adaptativa, como a ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos e o *switch* de classes de imunoglobulinas, que contribui para o *clearance* viral de outros flavivírus, de acordo com os trabalhos de Hughes *et al.* e Shrestha e Diamond. Também foi observado que a cepa asiática PE243 do ZIKV foi capaz de induzir a ativação de linfócitos T CD4+ foliculares, e que esta ativação está relacionada ao aumento da produção de IFN γ por essas células. Uma vez que essas células promovem a maturação de células B em plasmócitos e em células B de memória de longa duração (Miles *et al.*, 2016), a ativação de linfócitos T CD4+ foliculares pode ser um dos fatores que auxiliam no controle da infecção pela cepa PE243 de ZIKV em camundongos A129. O grande nível de produção de IFN γ por essas células pode ser responsável por coordenar um *switch* de classes de imunoglobulinas que, desta forma, é capaz de induzir a síntese de anticorpos com alto potencial neutralizante contra a cepa PE243 do ZIKV. Dados preliminares do nosso grupo mostram a presença de altos níveis de anticorpos específicos contra o domínio III da proteína de envelope (EDIII) do ZIKV na infecção por ambas as cepas PE243 e MR766, em diferentes momentos da infecção. Contudo, somente os anticorpos produzidos durante a infecção com a cepa PE243 possuem alto potencial neutralizante, sugerindo que o IFN γ liberado durante a infecção tem potencial participação na geração desses anticorpos neutralizantes. Os anticorpos anti-EDIII produzidos durante a infecção com a cepa MR766 não possuem alta capacidade neutralizante como àqueles contra a cepa PE243, o que pode levar à ocorrência de processos como ADE. A produção de anticorpos com baixa ação neutralizante durante a infecção com a cepa africana MR766, assim como a sua capacidade neutralizante e a sua associação ao ADE deveriam ser mais investigados no contexto da infecção por ZIKV.

Neste trabalho, descrevemos que o IFN γ possui papel crucial para a sobrevivência de camundongos A129 à infecção com a cepa asiática do ZIKV PE243, e que, além disso, a partir da transferência adotiva de linfócitos T CD4+ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa PE243 foi possível prevenir os animais da letalidade causada pela infecção com a cepa MR766. As células T CD4+ imunes proliferam *in vivo* frente ao desafio com a cepa africana MR766, produzindo altos níveis de IFN γ . Isso indica que a transferência de uma célula ativada em uma infecção primária e especializada na produção de IFN γ é capaz de conferir proteção contra infecção pelo ZIKV. Por outro lado, a transferência adotiva de linfócitos T CD4+ produtores de IFN γ e imunes contra a cepa

PE243, de camundongos A129 para camundongos AG129, não protege os animais da letalidade da infecção pela cepa asiática PE243 do ZIKV. Aliota *et al.* descreveu em seu trabalho a susceptibilidade e mortalidade de animais AG129 infectados com o ZIKV. Por serem incapazes de responder ao IFN γ , os camundongos AG129 sucumbem à infecção por ambas as linhagens de ZIKV e morrem mesmo recebendo linfócitos T CD4 $^{+}$ efetores. O acesso a dados da infecção de ZIKV no modelo AG129 nos permitiu avaliar a importância do reconhecimento de interferon do tipo II para controle e proteção contra a infecção. Portanto, os nossos dados indicam que IFN γ possui papel fundamental e essencial no controle da infecção, seja ativando a resposta imune adaptativa citotóxica quanto a humoral, como na promoção de proteção contra o ZIKV, em camundongos A129.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho colocam o IFN γ e os linfócitos T CD4 $^{+}$ como peças chave, essenciais para proteção e controle da infecção por ZIKV em camundongos A129. A letalidade da cepa africana neurotrópica MR766 do ZIKV pode ser prevenida a partir da transferência adotiva de linfócitos T CD4 $^{+}$ imunes (derivados de camundongos A129 infectados com a cepa PE243) em camundongos A129. Além disso, sugerimos que a proteção induzida por células T CD4 $^{+}$, seja dependente de IFN γ , uma vez que demonstramos a alta produção dessa citocina por estas células. Em adição, a letalidade em camundongos AG129 não pôde ser prevenida com transferências adotivas de linfócitos T CD4 $^{+}$ imunes produtores IFN γ , visto que estes animais são incapazes de responder ao estímulo gerado pelo reconhecimento de IFN γ . Sendo assim, o IFN γ possui papel fundamental e essencial no controle da infecção e promoção de proteção contra infecção por ZIKV em camundongos imunodeficientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aid, M., Abbink, P., Larocca, R. A., Boyd, M., Nityanandam, R., Nanayakkara, O., ... e Chandrashekar, A. (2017). Zika virus persistence in the central nervous system and lymph nodes of rhesus monkeys. *Cell*, 169(4), 610-620.
- Alera, M. T., Hermann, L., Tac-An, I. A., Klungthong, C., Rutvisuttinunt, W., Manasatienkij, W., ... e Lago, C. B. (2015). Zika virus infection, Philippines, 2012. *Emerging infectious diseases*, 21(4), 722.
- Aliota, M. T., Caine, E. A., Walker, E. C., Larkin, K. E., Camacho, E., & Osorio, J. E. (2016). Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(4), e0004682.
- Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., Aarons, E. J., ... e Hewson, R. (2016). Detection of Zika virus in semen. *Emerging infectious diseases*, 22(5), 940.
- Bardina, S. V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., ... e Stramer, S. L. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science*, 356(6334), 175-180.
- Beasley, D. W., Whiteman, M. C., Zhang, S., Huang, C. Y. H., Schneider, B. S., Smith, D. R., ... e Barrett, A. D. (2005). Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *Journal of virology*, 79(13), 8339-8347.
- Bhatnagar, J., Rabeneck, D. B., Martines, R. B., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Estetter, L. B., ... e Gary, J. (2017). Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. *Emerging infectious diseases*, 23(3), 405.
- Bogoch, I. I., Brady, O. J., Kraemer, M. U., German, M., Creatore, M. I., Kulkarni, M. A., ... e Watts, A. (2016). Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet (London, England)*, 387(10016), 335-336.
- Boorman, J. P. T., e Porterfield, J. S. (1956). A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of Zika virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(3), 238-242.
- Bowen, J. R., Zimmerman, M. G., e Suthar, M. S. (2017). Taking the defensive: Immune control of Zika virus infection. *Virus Research*.
- Bowen, J. R., Quicke, K. M., Maddur, M. S., O'Neal, J. T., McDonald, C. E., Fedorova, N. B., ... e Suthar, M. S. (2017). Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006164.
- Brasil Martines, R., Bhatnagar, J., Kelly Keating, M., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., e Gary, J. (2016). Evidence of zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses-Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65(6), 159-60.
- Brasil, P., Pereira Jr, J. P., Raja Gabaglia, C., Damasceno, L., Wakimoto, M., Ribeiro Nogueira, R. M., ... e Calvet, G. A. (4). March 2016. *Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro—preliminary report. N Engl J Med doi*, 10.
- Briant, L., Desprès, P., Choumet, V., e Missé, D. (2014). Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology*, 464, 26-32.
- Buathong, R., Hermann, L., Thaisomboonsuk, B., Rutvisuttinunt, W., Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., ... e Akrasewi, P. (2015). Detection of Zika virus infection in Thailand, 2012–2014. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 93(2), 380-383.
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., e Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1885.
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., ... e Musso, D. (2014). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(6), 1085.

- Cardoso, C. W., Paploski, I. A., Kikuti, M., Rodrigues, M. S., Silva, M. M., Campos, G. S., ... e Ribeiro, G. S. (2015). Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(12), 2274.
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., ... e Mekontso Dessap, A. (2016). Zika virus associated with meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1595-1596.
- CDC (2017) Zika Virus. Disponível em: <http://www.cdc.gov/zika/index.html>. Acesso em 26/6/2017.
- CDC (2016) Case Counts in the US. Disponível em: <http://www.cdc.gov/zika/geo/united-states.html>. Acesso em 26/6/2017.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., e Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine*, 3(8), 866-871.
- Cimini, E., Castilletti, C., Sacchi, A., Casetti, R., Bordoni, V., Romanelli, A., ... & Corpolongo, A. (2017). Human Zika infection induces a reduction of IFN- γ producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V δ 2 T-cells. *Scientific reports*, 7(1), 6313.
- Cook, K. D., e Whitmire, J. K. (2013). The depletion of NK cells prevents T cell exhaustion to efficiently control disseminating virus infection. *The Journal of Immunology*, 190(2), 641-649.
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L., Guimarães, K. P., ... e Polonio, C. M. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267-271.
- Darwish, M. A., Hoogstraal, H., Roberts, T. J., Ahmed, I. P., e Omar, F. (1983). A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 442-445.
- de Oliveira, W. K. (2016). Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy—Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65.
- De Smet, B., Van den Bossche, D., van de Werve, C., Mairesse, J., Schmidt-Chanasit, J., Michiels, J., ... e Cnops, L. (2016). Confirmed Zika virus infection in a Belgian traveler returning from Guatemala, and the diagnostic challenges of imported cases into Europe. *Journal of Clinical Virology*, 80, 8-11.
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., ... e Mongkolsapaya, J. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nature immunology*, 17(9), 1102-1108.
- Delvecchio, R., Higa, L. M., Pezzuto, P., Valadão, A. L., Garcez, P. P., Monteiro, F. L., ... e Caine, E. A. (2016). Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits Zika virus infection in different cell models. *Viruses*, 8(12), 322.
- Diagne, C. T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Gaye, A., ... e Diallo, M. (2015). Potential of selected Senegalese Aedes spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC infectious diseases*, 15(1), 492.
- Diallo, D., Sall, A. A., Diagne, C. T., Faye, O., Faye, O., Ba, Y., ... e Diallo, M. (2014). Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PloS one*, 9(10), e109442.
- Díaz-Menéndez, M., de la Calle-Prieto, F., Montero, D., Antolín, E., Vazquez, A., Arsuaga, M., ... e de Ory, F. (2016). Initial experience with imported Zika virus infection in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*.
- Dick, G. W. A. (1953). Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(1), 13-48.
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., e Haddow, A. J. (1952). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*

Hygiene, 46(5), 509-520.

Dick, G. W. A. (1952). Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 521-534.

Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... e Guillaumot, L. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536- 2543.

Duggal, N. K., Ritter, J. M., McDonald, E. M., Romo, H., Guirakhoo, F., Davis, B. S., ... & Brault, A. C. (2017). Differential neurovirulence of African and Asian genotype Zika virus isolates in outbred immunocompetent mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1410-1417.

Duijster, J. W., Goorhuis, A., van Genderen, P. J., Visser, L. G., Koopmans, M. P., Reimerink, J. H., ... e Hahné, S. J. (2016). Zika virus infection in 18 travellers returning from Surinam and the Dominican Republic, The Netherlands, November 2015–March 2016. *Infection*, 44(6), 797.

ECDC (2014) Rapid Risk Assessment: Zika Virus Infection Outbreak, French Polynesia. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Zika-virus-French-Polynesia-rapid-risk-assessment.pdf>. Acesso em: 26/6/2017.

Elong Ngono, A. E., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., ... e Shresta, S. (2017). Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary Zika virus infection in mice. *Cell host e microbe*, 21(1), 35-46.

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.

Fonseca, K., Meatherall, B., Zarra, D., Drebot, M., MacDonald, J., Pabbaraju, K., ... e Tellier, R. (2014). First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(5), 1035-1038.

Frank, C., Faber, M., e Stark, K. (2016). Causal or not: applying the Bradford Hill aspects of evidence to the association between Zika virus and microcephaly. *EMBO molecular medicine*, e201506058.

Geser, A., Henderson, B. E., e Christensen, S. (1970). A multipurpose serological survey in Kenya: 2. Results of arbovirus serological tests. *Bulletin of the World Health Organization*, 43(4), 539.

Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., e Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerging infectious diseases*, 21(1), 84.

Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Ondo, S. M., Jiolle, D., ... e Leroy, E. M. (2014). Zika virus in Gabon (Central Africa)–2007: a new threat from *Aedes albopictus*?. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(2), e2681.

Grifoni, A., Pham, J., Sidney, J., O'Rourke, P. H., Paul, S., Peters, B., ... e Silveira, C. G. (2017). Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. *Journal of Virology*, JVI-01469.

Gruber, M. F., e Krause, P. R. (2017). Regulating vaccines at the FDA: Development and licensure of Zika vaccines.

Guzmán, M. G., Kouri, G., Valdes, L., Bravo, J., Alvarez, M., Vazques, S., ... e Halstead, S. B. (2000). Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *American journal of epidemiology*, 152(9), 793-799.

Gyurech, D., Schilling, J., Schmidt-Chanasit, J., Cassinotti, P., Kaeppli, F., e Dobec, M. (2016). False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Med Wkly*, 146, w14296.

Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., ... e 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. H., e Goma, L. K. H. (1964). Twelve

- isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, 31(1), 57.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., ... e Cao-Lormeau, V. M. (2015). Biology of Zika virus infection in human skin cells. *Journal of virology*, 89(17), 8880-8896.
- Hammon, W. M., Schrack Jr, W. D., e Sather, G. E. (1958). Serological Survey for Arthropod-Borne Virus Infections in the Philippines¹. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 7(3), 323-328.
- Hastings, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H. F., ... e Fikrig, E. (2017). TAM receptors are not required for Zika virus infection in mice. *Cell Reports*, 19(3), 558-568.
- Heang, V., Yasuda, C. Y., Sovann, L., Haddow, A. D., da Rosa, A. P. T., Tesh, R. B., e Kasper, M. R. (2012). Zika virus infection, Cambodia, 2010. *Emerging infectious diseases*, 18(2), 349.
- Hennessey, M., Fischer, M., e Staples, J. E. (2016). Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016. *American Journal of Transplantation*, 16(3), 1031-1034.
- Hills, S. L. (2016). Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission—continental United States, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65.
- Honório, N. A., Câmara, D. C. P., Calvet, G. A., e Brasil, P. (2015). Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. *Cadernos de saude publica*, 31(5), 906-908.
- Huang, W. C., Abraham, R., Shim, B. S., Choe, H., e Page, D. T. (2016). Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Scientific reports*, 6, 34793.
- Hughes, H. R., Crill, W. D., Davis, B. S., e Chang, G. J. J. (2012). A West Nile virus CD4 T cell epitope improves the immunogenicity of dengue virus serotype 2 vaccines. *Virology*, 424(2), 129-137.
- Inovio, Inovio Pharmaceutical's DNA Vaccine for Zika Virus Induces Robust Immune Responses in Preclinical Study. Disponível em: <http://ir.inovio.com/news/news-releases/news-releasesdetails/2016/Inovio-Pharmaceuticals-DNA-Vaccine-forZika-Virus-Induces-Robust-Immune-Responses-in-PreclinicalStudy/default.aspx>. Acesso em: 25/6/2017.
- Ioos, S., Mallet, H. P., Goffart, I. L., Gauthier, V., Cardoso, T., e Herida, M. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*, 44(7), 302-307.
- Jan, C., Languillat, G., Renaudet, J., e Robin, Y. (1978). A serological survey of arboviruses in Gabon. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 71(2), 140-146.
- Jouannic, J. M., Friszer, S., Leparac-Goffart, I., Garel, C., e Eyrolle-Guignot, D. (2016). Zika virus infection in French Polynesia. *Lancet*, 387(10023), 1051-1052.
- Jurado, K. A., Yockey, L. J., Wong, P. W., Lee, S., Huttner, A. J., & Iwasaki, A. (2017). Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nature microbiology*.
- Kilpatrick, A. M., e Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*, 380(9857), 1946-1955.
- Kuno, G., Chang, G. J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of virology*, 72(1), 73-83.
- Kutsuna, S., Kato, Y., Takasaki, T., Moi, M., Kotaki, A., Uemura, H., ... e Hayakawa, K. (2014). Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill*, 19(4), 20683.
- Kwong, J. C., Druce, J. D., e Leder, K. (2013). Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 89(3), 516-517.
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... e Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia,

2007. *Emerging infectious diseases*, 14(8), 1232.

Larocca, R. A., Abbink, P., Peron, J. P. S., Paolo, M. D. A., Iampietro, M. J., Badamchi-Zadeh, A., ... e Li, Z. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, 536(7617), 474-478.

Lee, Y. R., Hu, H. Y., Kuo, S. H., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Yeh, T. M., ... e Liu, H. S. (2013). Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *Journal of biomedical science*, 20(1), 65-65.

Ledermann, J. P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S. C., Tided, M., Machieng, P., ... e Duffy, M. R. (2014). *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3188.

Lima, N. S., Rolland, M., Modjarrad, K., e Trautmann, L. (2017). T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. *Trends in Immunology*.

Lucchese, G., e Kanduc, D. (2016). Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barre syndrome, and beyond. *Autoimmunity reviews*, 15(8), 801-808.

Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139-145.

Marchette, N. J., Garcia, R., e Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 18(3), 411-415.

Maria, A. T., Maquart, M., Makinson, A., Flusin, O., Segondy, M., Leparco-Goffart, I., ... e Foulongne, V. (2016). Zika virus infections in three travellers returning from South America and the Caribbean respectively, to Montpellier, France, December 2015 to January 2016. *Eurosurveillance*, 21(6).

Metsky, H. C., Matranga, C. B., Wohl, S., Schaffner, S. F., Freije, C. A., Winnicki, S. M., ... e Lin, A. E. (2017). Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*, 546(7658), 411-415.

Miles, B., Miller, S. M., e Connick, E. (2016). CD4 T Follicular Helper and Regulatory Cell Dynamics and Function in HIV Infection. *Frontiers in immunology*, 7.

Miner, J. J., Sene, A., Richner, J. M., Smith, A. M., Santeford, A., Ban, N., ... e Noguchi, K. K. (2016). Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell reports*, 16(12), 3208-3218.

Monlun, E., Zeller, H., Le Guenno, B., Traore-Lamizana, M., Hervy, J. P., Adam, F., ... e Mondo, M. (1993). Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)*, 86(1), 21-28.

Morrison, T. E., & Diamond, M. S. (2017). Animal models of Zika virus infection, pathogenesis, and immunity. *Journal of Virology*, 91(8), e00009-17.

Musso, D., e Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 487-524.

Musso, D., Cao-Lormeau, V.M. e Gubler, D. J. (2015). Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet*, 386(9990), 243-244.

Musso, D., Roche, C., Nhan, T. X., Robin, E., Teissier, A., e Cao-Lormeau, V. M. (2015). Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*, 68, 53-55.

Musso, D., Nilles, E. J., e Cao-Lormeau, V. M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), O595-O596.

Nicastri, E., Pisapia, R., Corpolongo, A., Fusco, F. M., Cicalini, S., Scognamiglio, P., ... e Puro, V. (2016). Three cases of Zika virus imported in Italy: need for a clinical awareness and evidence-based knowledge. *BMC infectious diseases*, 16(1), 669.

Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., e 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.

Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparco-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., ... e Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease*

bulletin, 19(9).

Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., e Bispo de Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in Obstetrics e Gynecology*, 47(1), 6-7.

Olson, J. G., e Ksiazek, T. G. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 389-393.

Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, S. M., e 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.

PAHO/WHO (2016) Zika – Epidemiological Update. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&egid=36943&lang=en. Acesso em: 19/6/2017.

PAHO/WHO (2016) Zika Suspected and Confirmed Cases Reported by Countries and Territories in the Americas (Cumulative Cases), 2015–2016. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&egid=36937&lang=en. Acesso em 23/6/2017.

Paixão, E. S., Barreto, F., da Glória Teixeira, M., Maria da Conceição, N. C., e Rodrigues, L. C. (2016). History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: a systematic review. *American Journal of Public Health (ajph)*.

Pauli, G., Aepfelbacher, M., Bauerfeind, U., Bekeredjian-Ding, I., Bluemel, J., Burger, R., ... e Hildebrandt, M. (2016). Zika Virus (ZIKV) German Advisory Committee Blood, (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. *TRANSFUSION MEDICINE AND HEMOTHERAPY*, 43(6), 436-446.

Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., e Amara, A. (2013). Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses*, 6(1), 69-88.

Petersen, E. E. (2016). Interim guidelines for pregnant women during a Zika virus outbreak—United States, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65.

Pond, W. L. (1963). Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(5), 364-371.

Prestwood, T. R., Morar, M. M., Zellweger, R. M., Miller, R., May, M. M., Yauch, L. E., ... e Shrestha, S. (2012). Gamma interferon (IFN- γ) receptor restricts systemic dengue virus replication and prevents paralysis in IFN- α/β receptor-deficient mice. *Journal of virology*, 86(23), 12561-12570.

Pulendran, B., Oh, J. Z., Nakaya, H. I., Ravindran, R., e Kazmin, D. A. (2013). Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunological reviews*, 255(1), 243-255.

Pyke, A. T., Daly, M. T., Cameron, J. N., Moore, P. R., Taylor, C. T., Hewitson, G. R., ... e Gair, R. (2014). Imported Zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014. *PLoS currents*, 6.

Pyke, A. T., Moore, P. R., Hall-Mendelin, S., McMahon, J. L., Harrower, B. J., Constantino, T. R., e van den Hurk, A. F. (2016). Isolation of Zika virus imported from Tonga into Australia. *PLoS currents*, 8.

Rabaan, A. A., Bazzi, A. M., Al-Ahmed, S. H., Al-Ghaith, M. H., e Al-Tawfiq, J. A. (2017). Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. *Journal of infection and public health*, 10(2), 141-149.

Ramaiah, A., Dai, L., Contreras, D., Sinha, S., Sun, R., e Arumugaswami, V. (2017). Comparative analysis of protein evolution in the genome of pre-epidemic and epidemic Zika virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 74- 85.

Robin, Y., e Mouchet, J. (1974). Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, 68(3), 249-258.

Rossi, S. L., Tesh, R. B., Azar, S. R., Muruato, A. E., Hanley, K. A., Auguste, A. J., ... e Weaver, S. C.

- (2016). Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(6), 1362-1369.
- Saluzzo, J. F., Gonzalez, J. P., Herve, J. P., e Georges, A. J. (1981). Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic (author's transl). *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, 74(5), 490-499.
- Sapparapu, G., Fernandez, E., Kose, N., Cao, B., Fox, J. M., Bombardi, R. G., ... e Davidson, E. (2016). Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*, 540(7633), 443-447.
- Schmid, M. A., e Harris, E. (2014). Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS pathogens*, 10(12), e1004541.
- Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., e Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 745-759.
- Shrestha, B., e Diamond, M. S. (2004). Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *Journal of virology*, 78(15), 8312-8321.
- Siemann, D. N., Strange, D. P., Maharaj, P. N., Shi, P. Y., & Verma, S. (2017). Zika virus infects human Sertoli cells and modulates the integrity of the in vitro blood-testis barrier model. *Journal of Virology*, 91(22), e00623-17.
- Silveira, E. L., Rogers, K. A., Gumber, S., Amancha, P., Xiao, P., Woollard, S. M., ... e Villinger, F. (2017). Immune Cell Dynamics in Rhesus Macaques Infected with a Brazilian Strain of Zika Virus. *The Journal of Immunology*, 199(3), 1003-1011.
- Singh, M. V., Weber, E. A., Singh, V. B., Stirpe, N. E., e Maggirwar, S. B. (2017). Preventive and therapeutic challenges in combating Zika virus infection: are we getting any closer?. *Journal of neurovirology*, 23(3), 347.
- Sitati, E. M., & Diamond, M. S. (2006). CD4+ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *Journal of virology*, 80(24), 12060-12069.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., e Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352(6284), 467-470.
- Smithburn, K. C., Taylor, R. M., Rizk, F., e Kader, A. (1954). Immunity to certain arthropod-borne viruses among indigenous residents of Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(1), 9-18.
- Smithburn, K. C. (1952). Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *The Journal of Immunology*, 69(2), 223-234.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., e Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*.
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., ... e Foglierini, M. (2016). Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*, aaf8505.
- Sumathy, K., Kulkarni, B., Gondu, R. K., Ponnuru, S. K., Bonguram, N., Eligeti, R., ... e Ella, K. M. (2017). Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. *Scientific Reports*, 7.
- Summers, D. J., Acosta, R. W., e Acosta, A. M. (2015). Zika virus in an American recreational traveler. *Journal of travel medicine*, 22(5), 338-340.
- Tappe, D., Pérez-Girón, J. V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D. F., Jaenisch, T., ... e Schmidt-Chanasit, J. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical microbiology and immunology*, 205(3), 269-273.
- Tappe, D., Nachtigall, S., Kapaun, A., Schnitzler, P., Günther, S., e Schmidt-Chanasit, J. (2015). Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. *Emerging infectious diseases*, 21(5), 911.
- Tappe, D., Rissland, J., Gabriel, M., Emmerich, P., Gunther, S., Held, G., ... e Schmidt-Chanasit, J. (2014).

- First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, 19(4).
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., ... e Vera, L. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of virology*, 161(3), 665.
- Tripathi, S., Balasubramaniam, V. R., Brown, J. A., Mena, I., Grant, A., Bardina, S. V., ... e 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.
- Venturi, G., Zammarchi, L., Fortuna, C., Remoli, M. E., Benedetti, E., Fiorentini, C., ... e Bartoloni, A. (2016). An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. *Eurosurveillance*, 21(8).
- Viral Zone. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/39?outline=all_by_species. Acesso em 22/6/2017.
- Wæhre, T., Maagard, A., Tappe, D., Cadar, D., e Schmidt-Chanasit, J. (2014). Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(8), 1412.
- Waldorf, K. M. A., Stencel-Baerenwald, J. E., Kapur, R. P., Studholme, C., Boldenow, E., Vornhagen, J., ... e Armistead, B. (2016). Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nature medicine*, 22(11), 1256-1259.
- Wang, L., Valderramos, S. G., Wu, A., Ouyang, S., Li, C., Brasil, P., ... e Aliyari, R. (2016). From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. *Cell host e microbe*, 19(5), 561-565.
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., ... e Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral research*, 130, 69-80.
- Weinbren, M. P., e Williams, M. C. (1958). Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(3), 263-268.
- Weiskopf, D., Bangs, D. J., Sidney, J., Kolla, R. V., De Silva, A. D., De Silva, A. M., ... e Sette, A. (2015). Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), E4256-E4263.
- Weiskopf, D., Angelo, M. A., De Azeredo, E. L., Sidney, J., Greenbaum, J. A., Fernando, A. N., ... e Mattia, K. A. (2013). Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), E2046-E2053.
- WHO (2016) Director-general summarizes the outcome of the emergency committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barre syndrome. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>. Acesso em: 22/6/2017.
- WHO (2016) Zika situation report. Neurological syndrome and congenital abnormalities 2016 5 February. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/5-february-2016/en/>. Acesso em: 22/6/2017.
- WHO, Special Programme for Research, Training in Tropical Diseases, World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. Epidemic, e Pandemic Alert. (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization.
- Winkler, C. W., Myers, L. M., Woods, T. A., Messer, R. J., Carmody, A. B., McNally, K. L., ... e Peterson, K. E. (2017). Adaptive immune responses to Zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes. *The Journal of Immunology*, 198(9), 3526-3535.
- Wu, K. Y., Zuo, G. L., Li, X. F., Ye, Q., Deng, Y. Q., Huang, X. Y., ... e Luo, Z. G. (2016). Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell research*, 26(6), 645-654.
- Wu, K. Y., Zuo, G. L., Li, X. F., Ye, Q., Deng, Y. Q., Huang, X. Y., ... e Luo, Z. G. (2016). Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell research*, 26(6), 645-654.

- Yauch, L. E., Prestwood, T. R., May, M. M., Morar, M. M., Zellweger, R. M., Peters, B., ... e Shresta, S. (2010). CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5405-5416.
- Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., ... e Shresta, S. (2009). A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4865-4873.
- 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*, 358(6365), 933-936.
- Yun, S. I., Song, B. H., Frank, J. C., Julander, J. G., Polejaeva, I. A., Davies, C. J., ... e Lee, Y. M. (2016). Complete genome sequences of three historically important, spatiotemporally distinct, and genetically divergent strains of Zika virus: MR766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome announcements*, 4(4), e00800-16.
- Zammarchi, L., Stella, G., Mantella, A., Bartolozzi, D., Tappe, D., Günther, S., ... e Schmidt-Chanasit, J. (2015). Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *Journal of Clinical Virology*, 63, 32-35.
- Zanluca, C., e dos Santos, C. N. D. (2016). Zika virus—an overview. *Microbes and infection*, 18(5), 295-301.
- Zanluca, C., Melo, V. C. A. D., Mosimann, A. L. P., Santos, G. I. V. D., Santos, C. N. D. D., e Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569-572.
- Zé-Zé, L., Prata, M. B., Teixeira, T., Marques, N., Mondragão, A., Fernandes, R., ... e Alves, M. J. (2016). Zika virus infections imported from Brazil to Portugal, 2015. *IDCases*, 4, 46-49.
- Zellweger, R. M., Tang, W. W., Eddy, W. E., King, K., Sanchez, M. C., e Shresta, S. (2015). CD8+ T cells can mediate short-term protection against heterotypic dengue virus reinfection in mice. *Journal of virology*, 89(12), 6494-6505.
- Zellweger, R. M., e Shresta, S. (2014). Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 5.
- Zivna, I., Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Stephens, H. A., Chandanayingyong, D., ... e Rothman, A. L. (2002). T cell responses to an HLA-B* 07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5959-5965.