

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo da resposta imune inata celular *in vitro* contra *Dengue virus* e *Zika virus*

por

Natália Lima Pessoa

Belo Horizonte

2017

Natália Lima Pessoa

Estudo da resposta imune inata celular *in vitro* contra *Dengue virus* e *Zika virus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Marco Antônio da Silva Campos
Coorientação: Dra. Erna Geessien Kroon,
Dr. Alexandre de Magalhães Vieira
Machado

Belo Horizonte

2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P475e Pessoa, Natália Lima.
2017

Estudo da resposta imune inata celular *in vitro* contra *Dengue virus* e *Zika virus* / Natália Lima Pessoa. – Belo Horizonte, 2017.

XVII, 151 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 125 - 133

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Vírus da Dengue/imunologia 2. *Zika virus*/imunologia
3. Técnicas In Vitro/utilização I. Título. II. Campos, Marco Antônio da Silva (Orientação) III. Kroon, Erna Geessien (Coorientação) IV. Machado, Alexandre de Magalhães Vieira (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

Natália Lima Pessoa

Estudo da resposta imune inata celular *in vitro* contra *Dengue virus* e *Zika virus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Jaquelline Germano de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (UFMG) Titular

Prof. Dr. Pedro Augusto Alves (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 08/03/2017.

**“And the dreams that you dreamed of
Dreams really do come true”**

(Somewhere Over The Rainbow - Israel Kamakawiwo'ole)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo o apoio e incentivo ao longo de uma vida. Sem eles nada seria possível. Amo muito vocês!

Ao meu orientador, Marco, que acreditou e confiou em mim, me apoiou e me incentivou. E, principalmente, me ensinou muito! Muito obrigada por tudo, por estar sempre disponível para me ajudar, para esclarecer minhas dúvidas. E, muito obrigada pelos puxões de orelha... Hoje sei que eles foram muito necessários e me ajudaram a amadurecer durante o mestrado.

À minha coorientadora, Erna, que disponibilizou o espaço do labvírus (onde eu fiz muitos experimentos), materiais e pessoas para me ajudar. E ao meu coorientador Alexandre, que estava sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas.

Ao meu namorado, Nil, o que mais sofreu com meu estresse, meu mau humor, minha angústia... Perdeu momentos de diversão (como o carnaval)... desculpa amor! E obrigada por ser tão companheiro e me suportar nos piores momentos!! Te amo!!!

À minha família, principalmente à Titia, Titio, Vovó Marlene, Vovó Maildes e Vovô, obrigada por todo carinho! Amo muito vocês.

Ao pessoal do IDV, principalmente à Thaís, Bia, Kety e Gu, que me ajudaram em muitos experimentos, me deram muita força e me proporcionaram momentos de muita diversão comilança e gargalhadas. Amo vocês!

Ao pessoal do labvírus, que compartilhou deste espaço comigo. E principalmente à linda da Paulinha, que me ajudou **DEMAIS!** Que bom que eu te conheci e, melhor ainda, conquistei sua amizade. Ganhei uma grande amiga para vida!

À melhor turma da pós-graduação de todos os tempos! Foi ótimo conviver com vocês nestes dois anos. Foram muitos trabalhos, muitas apresentações, muitas angústias com experimentos, mas, principalmente, foi muitaaaaa diversão, muito CDF e muitas resenhas! Quero vocês para vida!

Ao Brunão, que me ensinou e me ajudou em todos os CBAs, sempre muito disponível e paciente. Sei que nesta vida de pós-graduando não é fácil separar um dia inteiro para ajudar uma pessoa, e você separou mais que um dia para me ajudar.

À toda plataforma de citometria do CPqRR. Principalmente à Tiza, que me auxiliou na leitura de todos os meus experimentos. E, à Carol Campi e Andréa Teixeira, que me auxiliaram nas análises.

A todos os meus amigos, que me ouviram desabafar, me apoiaram e me deram forças para continuar. Amo vocês!

A Deus.

RESUMO

Dengue virus (DENV) e *Zika virus* (ZIKV) pertencem ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. São arbovirus transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, porém, outros modos de transmissão vêm sendo relatados para ZIKV, como a transmissão vertical e sexual. DENV possui quatro sorotipos distintos (DENV 1 - 4), cada um com vários genótipos e todos são capazes de causar a dengue não grave, com e sem sinais de alarme, e a dengue grave. O ZIKV possui duas linhagens, a asiática e a africana. Já foi comprovado que a infecção tanto por DENV como por ZIKV podem causar complicações neurológicas graves. E, recentemente, ZIKV vem sendo relacionado com microcefalia e Síndrome de Guillain-Barre. Como somos um país endêmico para Flavivirus, o primeiro passo do trabalho foi comprovar que as amostras de ZIKV recebidas por nossa instituição eram realmente este vírus, e não havia coinfeção com DENV. Para isto, foi feita PCR em tempo real com iniciadores específicos para ZIKV e DENV e também nested PCR com iniciadores para DENV, demonstrando que o ZIKV foi positivo na PCR em tempo real e foi negativo para DENV pelo nested PCR. O objetivo principal desta dissertação foi comparar a resposta imune celular desencadeada por dois isolados distintos de DENV 3, um neurotrópico (genótipo I) e outro não neurotrópico (genótipo III). E também comparar a resposta imune desencadeada por dois isolados brasileiros de ZIKV (PE243 e SPH). O estudo a resposta imune desencadeada pelos vírus foi feito através da quantificação da produção de óxido nítrico e de diferentes citocinas, avaliando a susceptibilidade à infecção e multiplicação viral das diferentes células utilizadas neste trabalho e avaliando a ativação de TLR2 e/ou TLR4. Assim, macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6, células KG-1 e THP-1 foram infectadas com DENV e ZIKV, e os sobrenadantes destas células foram coletados em diferentes dias após a infecção. Os sobrenadantes foram analisados por reação de Griess, para a quantificação do óxido nítrico produzido pelas células e por CBA para a quantificação das citocinas. Também foi avaliado se estas células foram susceptíveis à infecção dos vírus, por titulação. Nas células KG-1, foi detectado DENV 3 genótipo I até o 10° d.p.i. e ZIKV até o 5° d.p.i., com títulos mais altos em comparação com os macrófagos murinos. Não foi detectado DENV 3 genótipo III nas células KG-1. Como só foram detectados vírus nos 1° e 2° d.p.i. nos macrófagos intraperitoneais de camundongo, é possível sugerir que os vírus foram inibidos pela capacidade destas células de produzir uma resposta imune inata eficaz contra a infecção por DENV e por ZIKV. Foi demonstrado que o NO e o IFN γ são importantes no controle da infecção por DENV 3. E que as citocinas TNF, IL-6 e a quimiocina MCP-1 estão relacionadas à infecção pelo sorotipo neurovirulento. E ainda, a ativação de TLR2 também é maior quando as células são infectadas pelo genótipo neurovirulento. Portanto, a resposta imune desencadeada pelo genótipo neurovirulento foi diferente em comparação com a resposta imune desencadeada pelo genótipo não neurovirulento. Também foi demonstrado que os dois isolados de ZIKV utilizados desencadeiam respostas imunes completamente diferentes, sendo que a amostra ZIKV PE243 desencadeou uma resposta imune mais forte, com produção de NO, maior produção das citocinas e ativação de TLR2 enquanto que a resposta imune desencadeada por ZIKV SPH foi mais branda, sem produção de NO, com menor produção de citocinas e sem a ativação de TLR2.

Palavras chave: *Dengue virus*, *Zika virus*, resposta imune inata celular, *in vitro*.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) and *Zika virus* (ZIKV) belong to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. They are arboviruses transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, however, other routes of transmission have been reported for ZIKV, such as vertical and sexual transmission. DENV has four distinct serotypes (DENV 1-4), each with several genotypes and all can cause non-severe dengue, with and without warning signals, and severe dengue. The ZIKV has two lineages, the Asian and the African. It has been proven that infection by both DENV and ZIKV can cause severe neurological complications. And recently, ZIKV has been linked to microcephaly and Guillain-Barre Syndrome. As we are an endemic country for Flavivirus, the first step of the work was to prove that the ZIKV samples received by our research center were really this virus, and there was no coinfection with DENV. For this, PCR was done in real time with specific primers for ZIKV and DENV and nested PCR with primers for DENV, demonstrating that the ZIKV was positive in the PCR in real time and was negative for DENV by the nested PCR. The main objective of this dissertation was to compare the cellular immune response triggered by two distinct isolates of DENV 3, one neurotropic (genotype I) and one non-neurotropic (genotype III). We also compare the immune response triggered by two Brazilian isolates of ZIKV (PE243 and SPH). The study of the immune response triggered by the virus was done by quantifying the production of nitric oxide and different cytokines, evaluating the susceptibility to infection and viral multiplication of the different cells used in this study and evaluating the activation of TLR2 and / or TLR4. Thus, intraperitoneal macrophages of C57BL / 6 mice, KG-1 and THP-1 cells were infected with DENV and ZIKV, and supernatants from these cells were collected on different days after infection. The supernatants were analyzed by Griess reaction, for quantification of the nitric oxide produced by the cells and by CBA for the quantification of the cytokines. It was also evaluated whether these cells were susceptible to virus infection by titration. In KG-1 cells, DENV 3 genotype I was detected up to 10° d.p.i. and ZIKV up to the 5° d.p.i., with higher titres compared to murine macrophages. No DENV 3 genotype III was detected in KG-1 cells. As only viruses were detected in the 1st and 2nd d.p.i. in mouse intraperitoneal macrophages, it is possible to suggest that viruses were inhibited by the ability of these cells to produce an innate immune response against infection by DENV and ZIKV. It has been shown that NO and IFN γ are important in the control of DENV 3 infection. And that the cytokines TNF, IL-6 and chemokine MCP-1 are related to infection by the neurovirulent serotype. Also, TLR2 activation is also enhanced when cells are infected by the neurovirulent genotype. Therefore, the immune response triggered by the neurovirulent genotype was different compared to the immune response elicited by the non-neurovirulent genotype. It has also been shown that the two ZIKV isolates used trigger completely different immune responses, and the ZIKV PE243 sample elicited a stronger immune response with NO production, increased cytokine production and activation of TLR2 whereas the immune response triggered by ZIKV SPH was milder, without NO production, with less production of cytokines and without the activation of TLR2.

Key words: *Dengue virus*, *Zika virus*, cellular innate immune response, *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do genoma e do processamento da poliproteína dos <i>Flavivirus</i>	25
Figura 2: Estrutura da partícula viral de <i>Flavivirus</i>	26
Figura 3: Ciclo de multiplicação dos <i>Flavivirus</i>	29
Figura 4: Sugestão de classificação de casos de dengue e níveis de gravidade.....	31
Figura 5: Ciclo de transmissão da Dengue.....	36
Figura 6: Co-circulação mundial dos quatro sorotipos de DENV.....	39
Figura 7: Países onde foi detectada infecções por ZIKV transmitidas por mosquito.....	42
Figura 8: Resposta imune inata do hospedeiro contra a infecção por <i>Dengue virus</i>	46
Figura 9: Mecanismos de evasão e subversão da resposta imune utilizados por DENV.....	49
Figura 10: Comprovação das amostras de ZIKV por PCR em Tempo Real.....	72
Figura 11: Comprovação da ausência de contaminação com DENV 1, 2, 3 e 4 das amostras de ZIKV, por PCR semi-nested.....	73
Figura 12: Ativação de TLR2 por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	75
Figura 13: Ativação de TLR2 por ZIKV PE243.....	77
Figura 14: Cinética da produção de óxido nítrico em células THP-1 após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	80
Figura 15: Cinética da produção de óxido nítrico em células THP-1 após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	81
Figura 16: Cinética da produção de óxido nítrico em células KG-1 após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	84
Figura 17: Cinética da produção de óxido nítrico em células KG-1 após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	85
Figura 18: Cinética da produção de óxido nítrico em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e DENV 3 genótipo III.....	87
Figura 19: Cinética da produção de óxido nítrico em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	88
Figura 20: Níveis de IL-6 produzido por células KG-1 após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	95
Figura 21: Níveis de IFN γ produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	99

Figura 22: Níveis de IFN γ produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	100
Figura 23: Níveis de TNF produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	102
Figura 24: Níveis de TNF produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	103
Figura 25: Níveis de IL-6 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	105
Figura 26: Níveis de IL-6 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	106
Figura 27: Níveis de IL-10 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	107
Figura 28: Níveis de IL-10 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	108
Figura 29: Níveis de MCP-1 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	110
Figura 30: Níveis de MCP-1 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH.....	111

LISTA DA TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real para a confirmação das amostras de ZIKV.....	65
Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificar os sorotipos de DENV no PCR semi-nested.....	66
Tabela 3: Produção de IFN γ em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	90
Tabela 4: Produção de IFN γ em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH.....	91
Tabela 5: Produção de TNF em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	92
Tabela 6: Produção de TNF em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH.....	93
Tabela 7: Produção de IL-6 em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	94
Tabela 8: Produção de IL-10 em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	96
Tabela 9: Produção de IL-10 em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH.....	97
Tabela 10: Título viral dos sobrenadantes de células KG-1 e macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III.....	113
Tabela 11: Título viral dos sobrenadantes de células KG-1 e macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e SPH.....	114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE - exacerbação da resposta imune dependente de anticorpo
ATCC - American Type Culture Collection

B.O.D. - Demanda biológica de oxigênio
BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

C – Proteína do capsídeo
CBA - Citometria por Arranjo de Beads
CCL5 - ligante 5 da quimiocina CC
cDNA - DNA complementar
CEUA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
CMC - carboximetil celulose
CNS - Sistema Nervoso Central
CPqRR. – Centro de Pesquisas René Rachou
CXCL8 - ligante 8 da quimiocina CXC

d.p.i. - dias pós infecção
DC-SIGN – molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas
DENV - *Dengue virus*
DMEM - meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNTPs- Desoxirribonucleotídeos
dsRNA - RNA de fita dupla

E – proteína do envelope
ECP - efeito citopático
EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético
ER - Retículo endoplasmático

g - Força gravitacional
GPI – glicosilfosfatidilinositol

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IFN- Interferon
IFNAR - interferon- α/β receptor
IL- Interleucina
IRF – fator regulatório de interferon
iRNA - RNA de interferência
ISG - Genes estimulados por interferon

JEV - *Japanese encephalitis virus*
kDa- Quilodalton

LPS - lipopolissacarídeo

m.o.i. - Multiplicidade de infecção

MAVS - proteína de sinalização antiviral mitocondrial

MCP1- Proteína quimioatraente de macrófagos 1

MDA5 - gene 5 associado à diferenciação de melanoma

MFI - intensidade média de fluorescências

mg – Miligramas

min.- minutos

miRNA - micro RNA

mL – Mililitros

mM – Milimolar

mRNA- RNA mensageiro

µg/mL- Micrograma/mililitro

µL- Microlitro

NCR- Regiões não codificantes

NFκB - Fator nuclear kappa B

ng – Nanogramas

NI - Não infectados

NK - Células “natural killer”

nm - Nanômetro

NO - Óxido nítrico

NS – Proteínas não estruturais

NS1 - Proteína não estrutural 1

NS2A - Proteína não estrutural 2A

NS2B - Proteína não estrutural 2B

NS3 - Proteína não estrutural 3

NS4A - Proteína não estrutural 4A

NS4B - Proteína não estrutural 4B

NS5 - Proteína não estrutural 5

ORF - Janela aberta de leitura

p.f.u. - Unidades formadoras de placa

PAMP – Padrão molecular associado a patógeno

pb - Pares de bases

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pg/mL – picogramas / mililitro

pH - Potencial hidrogeniônico

prM / M – proteína precursora da proteína M / proteína M

PRR – Receptor de reconhecimento padrão

q.s.p. – Quantidade suficiente para

r.p.m. - Rotações por minuto

RIG-I - gene I indutor de ácido retinóico

RNA - Ácido ribonucleico

SFB- Soro fetal bovino

sfRNA - subgenômico de flavivirus

ssRNA - RNA de fita simples

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição

TIM - domínio mucina e imunoglobulina de células T

TLR - Receptor do tipo Toll

TNF- Fator de necrose tumoral

TNG - Rede trans-Golgi

TRAF - fatores associados ao receptor de TNF

TRIF – Adaptador indutor de Interferon β contendo domínio TIR

VEGFA - fator A de crescimento endotelial vascular

WHO – World Health Organization

WNV - *West Nile virus*

YFV - *Yellow fever virus*

ZIKV - *Zika virus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Dengue virus</i>	18
1.2	<i>Zika virus</i>	20
1.3	Vírus da família <i>Flaviviridae</i>	22
1.4	Vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	23
1.4.1	Partícula viral e genoma.....	24
1.4.2	Proteínas virais	26
1.4.3	Ciclo de multiplicação viral dos <i>Flavivirus</i>	28
1.5	Manifestações clínicas.....	30
1.5.1	Manifestações clínicas – <i>Dengue virus</i>	30
1.5.2	Manifestações clínicas – <i>Zika virus</i>	33
1.6	Transmissão e Epidemiologia	34
1.6.1	Transmissão e Epidemiologia – <i>Dengue virus</i>	34
1.6.2	Transmissão e Epidemiologia – <i>Zika virus</i>	39
1.7	Patogênese e Resposta imune.....	43
1.7.1	Patogênese e Resposta imune – <i>Dengue virus</i>	43
1.7.2	Patogênese e Resposta imune – <i>Zika virus</i>	50
2	JUSTIFICATIVA.....	52
3	OBJETIVOS	54
3.1	Objetivo geral.....	54
3.2	Objetivos específicos.....	54
4	METODOLOGIA	55
4.1	Estratégias de trabalho	55
4.2	Animais	59
4.2.1	Anestesia	59
4.3	Cultivo celular	59
4.3.1	Células C6/36	59
4.3.2	Células Vero.....	60
4.3.3	Células BHK-21	60
4.3.4	Células CHO	60
4.3.5	Células THP-1	61
4.3.6	Células KG-1.....	61
4.3.7	Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6.....	62

4.4	DENV 3.....	62
4.4.1	Multiplicação de DENV 3.....	63
4.4.2	Titulação de DENV 3.....	63
4.5	ZIKV	64
4.5.1	Confirmação das espécies virais.....	64
4.6	Verificação da ativação de TLR 2 e TLR 4 em células CHO por citometria de fluxo.....	67
4.7	Infeção e coleta dos sobrenadantes das células THP-1 e KG-1.....	68
4.8	Infeção e coleta dos sobrenadantes dos macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6.....	68
4.9	Verificação da produção de NO induzida por DENV e ZIKV em células KG-1, THP-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6.....	69
4.10	Quantificação das citocinas produzidas pelas células KG-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6.....	70
4.11	Titulação viral dos sobrenadantes das células KG-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6.....	71
5	RESULTADOS.....	72
5.1	Confirmação da autenticidade das amostras de ZIKV	72
5.2	Ativação de TLR2 e/ou 4 por DENV e ZIKV em células CHO transfectadas estavelmente com estes TLRs	74
5.2.1	Ativação de TLR 2 e/ou TLR 4 em células CHO que expressam TLR 2 e TLR 4 expostas aos DENV genótipo I e genótipo III.....	75
5.2.2	Ativação de TLR 2 e/ou TLR 4 em células CHO que expressam TLR 2 e TLR 4 expostas aos ZIKV PE243 e SPH	77
5.3	Cinética de produção de Óxido Nítrico (NO) em células infectadas THP-1, KG-1 e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	79
5.3.1	Cinética de produção de NO por células THP-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	79
5.3.2	Cinética de produção de NO por células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	82
5.3.3	Cinética de produção de NO por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 WT infectados com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	85
5.3.4	Cinética de produção de citocinas em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	89
5.3.5	Cinética de produção de citocinas em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	98
5.3.6	Titulação viral dos sobrenadantes de células infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH.....	112
6	DISCUSSÃO.....	115

7 CONCLUSÃO	124
REFERÊNCIAS	125
ANEXOS.....	134
Anexo I - Licença LW-7/16	134
Anexo II - Licença LW-33/16.....	135
Anexo III - Participação em Artigos Científicos.....	136

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Dengue virus*

O *Dengue virus* (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que compreende vírus envelopados, de genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva (SCREATON et al., 2015). O vírus possui quatro sorotipos distintos (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4), cada um com vários genótipos. Os sorotipos diferem um do outro de 25% a 40% no nível de aminoácidos e os genótipos variam entre si em aproximadamente 3% (DIAMOND; PIERSON, 2015). Todos os sorotipos são capazes de causar a doença mais branda e as doenças mais grave, a dengue grave (GREEN et al., 2015).

A dengue é uma arbovirose, transmitida pelas fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, cuja distribuição geográfica continua a se expandir, levando também à expansão da doença (SCREATON et al., 2015). Desde 1950 há um considerável aumento da incidência de dengue, sendo estimado que a incidência anual global seja de 390 milhões de casos, dos quais 96 milhões são clinicamente aparentes (BHATT et al., 2013), 2 milhões são casos de doença grave e ocorrem 21 mil mortes por ano (WHO, 2012; GUZMAN et al., 2016). A dengue evoluiu de uma doença esporádica para um grande problema de saúde pública com substancial efeito econômico e social devido ao aumento da extensão geográfica, número de casos e gravidade da doença (GUZMAN; HARRIS, 2015).

A incidência da dengue ocorre nas regiões do Mediterrâneo Oriental, América, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e África, com novos casos ocorrendo e se espalhando para as áreas não endêmicas nos Estados Unidos e Europa (GUZMAN et al., 2016). As principais causas desta pandemia são o aumento da população (GUZMAN et al., 2016), a globalização, a propagação dos vetores, a urbanização inadequada e a ausência de drogas terapêuticas (SCREATON et al., 2015).

A dengue apresenta um grande fardo econômico tanto para o governo como para os indivíduos. A doença nas Américas custa em média US\$2,1 bilhões por ano, excluindo o controle de vetores, excedendo os custos de outras doenças virais (SHEPARD et al., 2011). No

Sudeste Asiático foram estimados 2,9 milhões de episódios da doença com 5906 mortes, com um prejuízo anual de \$950 milhões (SHEPARD; UNDURRAGA; HALASA, 2013).

A dengue é uma doença humana que não possui reservatórios animais conhecidos, o vírus evoluiu com sucesso para evadir das respostas imunes, especialmente da resposta imune inata antiviral (GREEN et al., 2015). Ainda não existe tratamento antiviral específico (GREEN et al., 2015), embora existam alguns candidatos vacinais neste momento no mercado. O maior desafio para o desenvolvimento de vacinas e terapias é que, embora a infecção com um sorotipo promova imunidade contra o próprio sorotipo, a infecção subsequente com outro sorotipo pode levar à doença grave (SCHMID; DIAMOND; HARRIS, 2014). Os mecanismos pelos quais a resposta imune do hospedeiro à DENV fornece proteção ou aumento da infecção secundária ainda permanecem insuficientemente compreendidos (SCHMID; DIAMOND; HARRIS, 2014). Por esses motivos, ainda são necessários estudos para uma melhor compreensão de como o vírus invade as células do hospedeiro e como ele é capaz de evadir da resposta imune humana, principalmente em relação à resposta imune inata, a qual é o alvo de estudo deste projeto.

1.2 *Zika virus*

Assim como o DENV, o *Zika virus* (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (SAIZ, 2016). Como todos os flavivírus, são vírus envelopados e possuem RNA de fita simples de polaridade positiva (SAIZ, 2016). O ZIKV é relacionado ao *Spondweni virus*, ambos formam um clado único, dentro do cluster dos flavivírus transmitidos por mosquitos (KUNO et al., 1998). A partir de análises filogenéticas, foram definidas duas linhagens de ZIKV, a asiática e a africana (ALERA et al., 2015; HADDOW et al., 2012; SAIZ, 2016). A linhagem africana é dividida em dois grupos, um grupo do Leste da África, contendo as variantes genéticas do ZIKV isolado em Uganda em 1947, e o outro grupo que inclui os isolados de África Ocidental (OLSON et al., 1981; SAIZ, 2016).

O ZIKV, assim como DENV, também é transmitido pelos mosquitos do gênero *Aedes* (SAVIDIS et al., 2016). Porém, outros modos de transmissão vêm sendo relatados como a transmissão sexual (HILLS, 2016) e vertical (BRASIL; NIELSEN-SAINES, 2016; KLEBER GIOVANNI, LUZ; GLAUCO IGOR VIANA DOS, SANTOS; RENATA DE MAGALHÃES et al., 2016; SINGH et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947, isolado de um macaco *Rhesus*, na Floresta de Zika, em Uganda (DICK, 1952). Assim, o vírus recebeu seu nome em função da área geográfica onde os primeiros isolamentos foram feitos (SAIZ, 2016). A primeira infecção humana foi relatada na Nigéria, em 1954 (MACNAMARA, 1954). Até recentemente era considerado que o ZIKV causava infecções de evolução benignas e esporádicas em humanos na África e na Ásia (ENFISSI et al., 2016). Em 2007, um surto foi relatado nos Estados Federados de Micronésia (YAP), marcando a primeira detecção do vírus fora da África e Ásia (WHO, 2015). E em 2013-2014, o ZIKV causou uma grande epidemia na Polinésia Francesa, antes de se espalhar pelo Pacífico (ENFISSI et al., 2016). Esta grande epidemia ocorreu concomitantemente com a circulação de DENV e com o aumento incomum de complicações neurológicas graves, como a Síndrome de Guillain-Barré (OEHLER et al., 2014) e malformações neurológicas congênitas (ENFISSI et al., 2016). A circulação autóctone de ZIKV tem sido detectada nas Américas desde 2014 (WHO, 2015). Em maio de 2015, foi relatada a presença do vírus no Brasil e, posteriormente, em vários países da América Central, do Sul e Caribe (FARIA et al., 2016). No Brasil, o ZIKV foi relacionado com os casos de microcefalia, já que o surto do vírus ocorreu juntamente com o aumento da incidência de microcefalia, e

ainda, foi detectado ZIKV em tecidos cerebrais de fetos microcefálicos e no líquido amniótico de gestantes com fetos com microcefalia (CALVET et al., 2016; DRIGGERS et al., 2016; LI et al., 2016; MARRS et al., 2016; MLAKAR et al., 2016). Os recentes surtos de infecção por ZIKV em diferentes regiões do mundo ressaltam o potencial de propagação do vírus nas Américas e outros locais, onde quer que o vetor esteja presente (WHO, 2015). Dada a disseminação mundial do Chikungunya e da Dengue, associada à urbanização e à globalização, existe um risco potencial de surtos de infecção urbana de ZIKV, em qualquer parte do mundo onde o mosquito vetor esteja presente ou possa se estabelecer no futuro (WHO, 2015).

Como ocorre para a dengue, não existem tratamentos específicos para a Zika, não há antivirais ou vacinas, sendo que o tratamento é direcionado para o alívio dos sintomas com analgésicos e antitérmicos (SAIZ, 2016). A ausência de tratamento específico, a rápida dispersão e as diferentes maneiras de transmissão do ZIKV tornam ainda mais importante o conhecimento sobre o vírus, e, principalmente, da resposta imune relacionada a ele. Assim, o estudo da resposta imune celular contra o ZIKV é um dos alvos de estudo deste projeto. Como o ZIKV foi introduzido no Brasil em regiões endêmicas para DENV, resolvemos também nos certificar de que nossas amostras virais de ZIKV não estavam misturadas com DENV.

1.3 Vírus da família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é uma grande família de pequenos vírus envelopados de RNA de cadeia positiva, com genoma de aproximadamente 9.0 a 13kb. Os vírus são esféricos, com um envelope lipídico e possuem uma proteína do capsídeo única e básica, e duas (para os gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*) ou três (gênero *Pegivirus*) proteínas de envelope. O genoma contém uma janela aberta de leitura única (ORF), longa e flanqueada por regiões não codificantes de 5'-3'terminal, as quais formam estruturas secundárias específicas necessárias para a tradução e replicação do genoma (SIMMONDS et al., 2017).

Segundo o 10º Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), publicado em 2017, a família *Flaviviridae* é formada por quatro gêneros: *Flavivirus* (do latim *flavus*, amarelo), *Pestivirus* (do latim *pestis*, peste), *Hepacivirus* (do grego *hepar*, hepatos, fígado) e *Pegis* (de “Pe” para persistente e “G” para os nomes originais dos vírus GB e da hepatite G) (SIMMONDS et al., 2017). Os membros desta família compartilham semelhanças na morfologia do virion, na organização do genoma e na estratégia de replicação, mas exibem diferentes propriedades biológicas e ausência de reatividade cruzada sorológica (LINDENBACH; RICE, 2007).

O gênero *Flavivirus* consiste em mais de 50 espécies de vírus transmitidos por artrópodes, com grupos distintos que infectam mosquitos ou carrapatos. Os mamíferos e as aves são os hospedeiros primários habituais, nos quais as infecções variam de assintomática a febre hemorrágica grave ou fatal ou a doença neurológica. Possui como membros patógenos humanos importantes, como o *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV) e o *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV). Outros vírus deste gênero causam doenças economicamente importantes em animais domésticos e selvagens. Outros vírus que infectam somente artrópodes ou somente mamíferos, como o vírus do morcego de Tamana, foram descritos recentemente (SIMMONDS et al., 2017).

Os vírus do gênero *Pestivirus* infectam porcos e ruminantes, incluindo bovinos, ovinos, caprinos e ruminantes selvagens, e são transmitidos através do contato com secreções contaminadas (partículas respiratórias, urina ou fezes). As infecções podem ser subclínicas ou podem causar doenças entéricas ou hemorrágicas. O vírus da diarreia viral bovina e o vírus da peste suína clássica são exemplos de membros deste gênero. Outros vírus cuja patogenicidade

não é conhecida, infectam morcegos e ratos e foram identificados recentemente (SIMMONDS et al., 2017).

O gênero *Hepacivirus* inclui o Vírus da Hepatite C (HCV), um importante patógeno humano que causa doença crônica no fígado, incluindo cirrose e câncer. Também neste gênero são incluídos vários outros vírus de patogenicidade desconhecida que infectam cavalos, roedores, morcegos, gado e primatas. As infecções são tipicamente persistentes e tem como alvo o fígado (SIMMONDS et al., 2017).

Os membros do gênero *Pegivirus* são amplamente distribuídos em uma variedade de espécies de mamíferos, nos quais eles causam infecções persistentes. Até recentemente eles ainda não foram claramente associados com doenças.

1.4 Vírus do gênero *Flavivirus*

Os flavivírus, são envelopados, possuem genoma de RNA de fita simples (ssRNA) senso-positivo, alguns possuem características neuroinvasivas, sendo considerados como vírus neurotrópicos (NEAL, 2014). O gênero consiste em 53 espécies (ICTV, 2018), muitos dos quais são patógenos humanos e causam diversas doenças como febres, encefalites e febres hemorrágicas (LINDENBACH B., THIEL H., 2007).

A maioria dos *Flavivirus* são arbovírus, ou seja, vírus transmitidos por artrópodes, sendo que mais da metade é transmitida por mosquitos e aproximadamente um terço é transmitido por carrapatos (VON GIESEN, 2016).

Os *Flavivirus* foram originalmente caracterizados sorologicamente e divididos em 8 complexos antigênicos e 12 subcomplexos, baseados em ensaios de neutralização com soro hiper-imune (ROEHRIG, 2003; VON GIESEN, 2016). As análises filogenéticas de seqüências genômicas de isolados de *Flavivirus* arquivadas e recentes têm, na maioria dos casos, confirmado os sorotipos determinados anteriormente por sorologia (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; VON GIESEN, 2016).

Em regiões onde ocorre a co-circulação de flavivírus, uma pessoa está em risco de infecção, uma vez que uma infecção prévia por algum flavivírus não previne a infecção por outro flavivírus. E ainda, os anticorpos produzidos durante a primeira infecção podem modular a segunda infecção, resultando em uma doença mais leve ou mais grave (VON GIESEN, 2016).

A importância médica dos flavivírus está associada a três síndromes clínicas: encefalite e meningite, febre hemorrágica, ou febre, artralgia e rash (GOULD; SOLOMON, 2008; VON GIESEN, 2016).

1.4.1 Partícula viral e genoma

Os flavivírus são esféricos, com simetria icosaédrica e possuem 50nm de diâmetro (LINDENBACH B., THIEL H., 2007). O vírus é composto pelo envelope viral, pela proteína de membrana, por uma bicamada lipídica derivada de células hospedeiras e pelo nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo consiste de múltiplas cópias da proteína do capsídeo, arranjado de forma icosaédrica, que ancora o RNA genômico (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; KUHN et al., 2002; LINDENBACH B., THIEL H., 2007; VON GIESEN, 2016).

O genoma dos flavivírus é composto por RNA de fita simples senso-positivo, de aproximadamente 11kb, o qual funciona como um RNA mensageiro (mRNA), com uma janela aberta de leitura única (ORF). O genoma é flanqueado nas extremidades 5' e 3' por regiões não codificantes (NCR), as quais contêm motivos de sequência de RNA que estão envolvidos na tradução e na replicação viral e, provavelmente, no empacotamento do RNA viral (SIMMONDS et al., 2017). As proteínas virais são traduzidas em uma poliproteína que é clivada por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais: envelope (E), pré-membrana / membrana (prM / M) e capsídeo (C); e em sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Figura 1) (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; ZHANG et al., 2003). As proteínas estruturais formam a partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais funcionam principalmente na replicação viral e na montagem da partícula viral, em conjunto com os fatores das células hospedeiras (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH B., THIEL H., 2007).

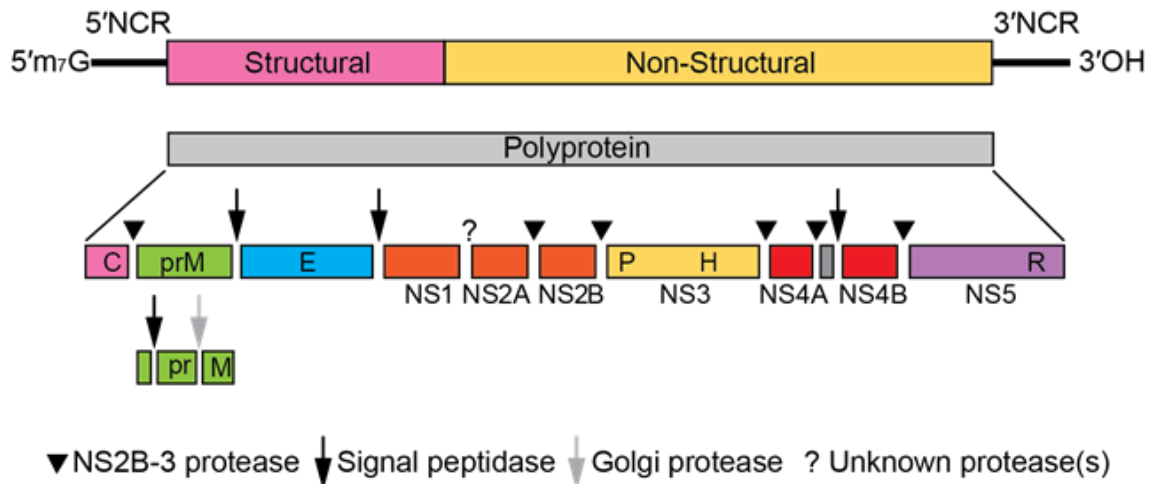


Figura 1: Organização do genoma e do processamento da poliproteína dos *Flavivirus*. No topo está o genoma viral com as regiões codificadoras das proteínas estruturais (structural) e não estruturais (non-structural) e as regiões não codificantes (5'NCR e 3'NCR). No centro está representada a poliproteína que é clivada por proteases hospedeiras e virais em três proteínas estruturais (C, prM / M e E) e sete proteínas não estruturais (NS: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A prM é clivada após a liberação das partículas virais através da membrana plasmática de células. C: capsídeo; E: envelope, prM: pré-membrana, M: membrana; NCR: regiões não codificantes; NS: proteínas não estruturais (SIMMONDS et al., 2017).

A superfície da partícula viral é composta pelas proteínas E e M. A glicoproteína E, o principal determinante antigênico das partículas virais, é responsável pela mediação da ligação e fusão durante a entrada do vírus. A proteína prM, produzida durante a maturação das partículas virais nas vias de secreção, é um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora (M) (LINDENBACH; RICE, 2007). Portanto, pode-se distinguir duas formas da partícula viral (Figura 2), o vírus maduro, que contém duas proteínas associadas à membrana codificadas pelo vírus, a proteína E e a proteína M, e a partícula viral intracelular imatura, que contém o prM e não a proteína M, o qual é clivado durante a maturação da partícula viral (SIMMONDS et al., 2017).

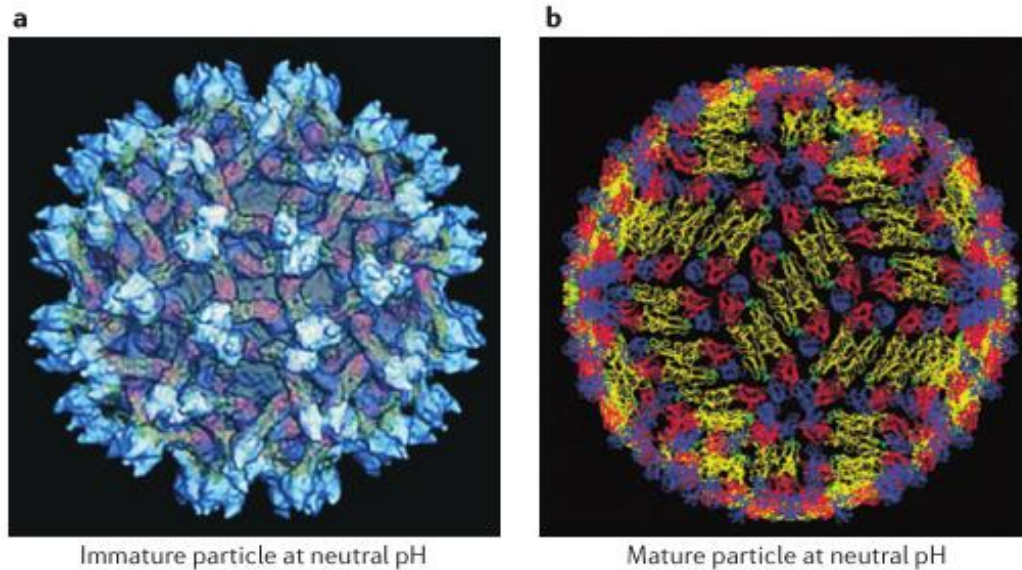


Figura 2: Estrutura da partícula viral de Flavivirus (*Dengue virus*, no caso). **a.** A estrutura de uma partícula viral imatura, mostrando o arranjo das proteínas do envelope (E) em rosa e as proteínas do envelope precursor da membrana (prM) em azul claro. **b.** *Dengue virus* maduro, mostrando o arranjo das proteínas do envelope (E) em uma partícula lisa (SCREATON et al., 2015).

1.4.2 Proteínas virais

A proteína E é uma molécula dimérica, em forma de bastonete, que é orientada paralelamente à membrana e não forma projeções na sua conformação em pH neutro (SINGH et al., 2017; YU et al., 2008). É a principal proteína da superfície da partícula viral. Esta proteína interage com receptores específicos da célula hospedeira, durante a ligação do vírus à superfície celular, e está envolvida na fusão das membranas e na entrada do vírus. Portanto, ela é um importante determinante para o tropismo tecidual e virulência. (ROEHRIG, 2003; VON GIESEN, 2016). E ainda, a proteína E é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes do hospedeiro e induz imunidade protetora (SIMMONDS et al., 2017).

A proteína prM auxilia no dobramento da proteína E, como uma espécie de chaperona, e impede a fusão prematura das partículas antes de serem liberadas da célula infectada. E ainda, a clivagem de prM na proteína M também promove a maturação das partículas virais (DRIGGERS et al., 2016; SAIZ, 2016). A proteína M é sintetizada a partir do precursor de proteína (prM) e está presente nas partículas virais maduras. A maturação viral ocorre na rede Trans-Golgi, onde uma protease celular, provavelmente a furina, cliva prM, gerando a proteína M e o peptídeo pr. Após a clivagem, o peptídeo pr continua associado à partícula viral em pH

ácido, o qual é um mecanismo que previne a fusão do virion na rede Trans-Golgi (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). Após a exocitose do vírus a partir da célula do hospedeiro, a proteína pr se dissocia, deixando o vírus maduro (SCREATON et al., 2015).

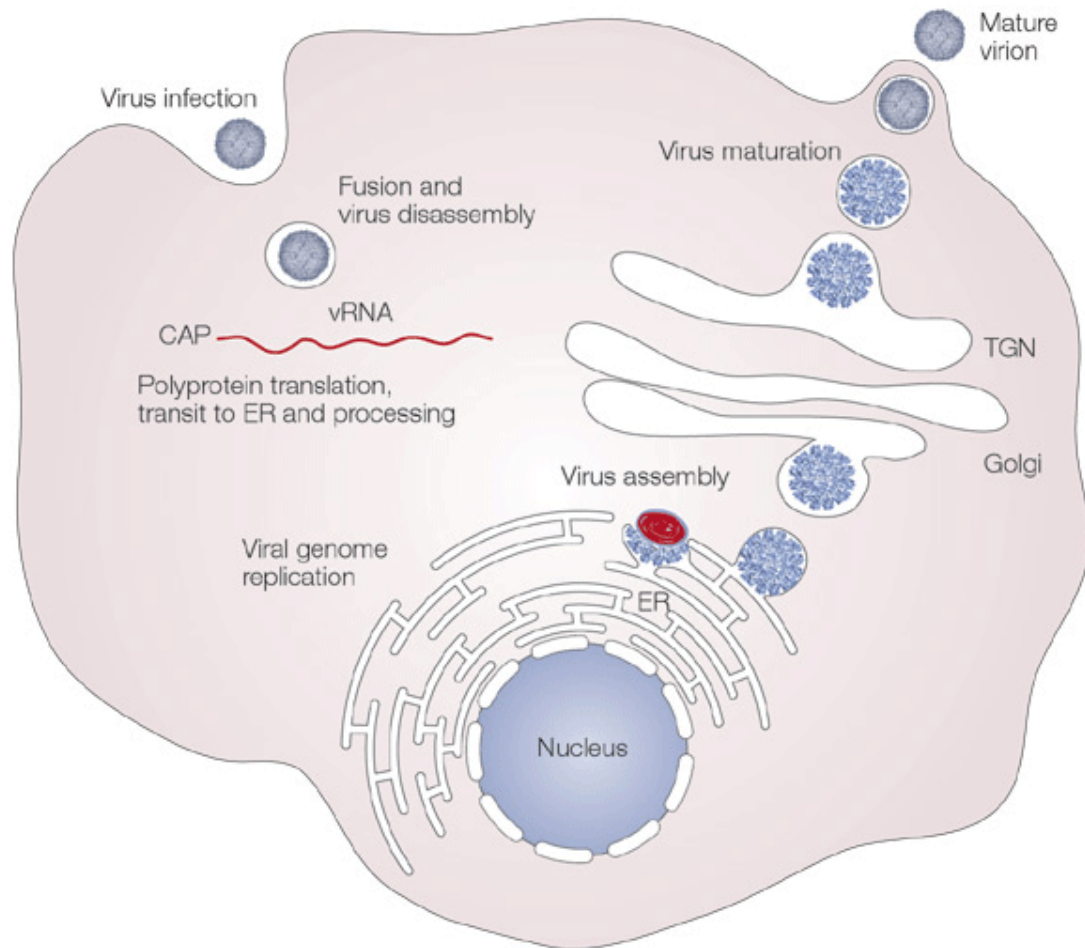
A proteína C é uma proteína extremamente básica, pequena e está incluída na família das proteínas supercarregadas. Estas características a tornam capaz de atuar como um peptídeo penetrante nas células, distribuindo macromoléculas em células, ou seja, ela possui a habilidade de translocar ácidos nucleicos entre membranas celulares (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). A principal função da proteína C é a montagem do nucleocapsídeo e sua incorporação nas partículas virais em formação (ROBY et al., 2015).

As proteínas não estruturais (NS) estão envolvidas nos processos de replicação viral e empacotamento, os quais estão vinculados ao retículo endoplasmático (ER) do hospedeiro e à função da via secretora (GUZMAN et al., 2016). A proteína NS1 existe em três formas: a forma residente no ER, a forma ancorada à membrana e a forma secretada. A NS1 intracelular participa da replicação do RNA viral e é encontrada nos compartimentos vesiculares induzidos pelo vírus, que alojam os complexos de replicação virais. Esta proteína também é transportada para a superfície celular, onde ela pode ficar associada à membrana ou pode ser secretada em sua forma solúvel. A forma solúvel da NS1 ativa o sistema imune inato e está envolvida no vazamento vascular (GUZMAN et al., 2016; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; MULLER; YOUNG, 2013). A proteína NS2A está envolvida na replicação do RNA viral. A proteína NS2B é co-fator para a proteína NS3 (GUZMAN et al., 2016; XIE et al., 2015), e ainda, junto com o terço N-terminal de NS1, formam um complexo de protease viral, o qual está envolvido no processamento da poliproteína (SIMMONDS et al., 2017). A NS3 é uma proteína multifuncional que possui vários domínios catalíticos, estando envolvida nas funções de helicase e trifosfatase durante a síntese de RNA (GUZMAN et al., 2016; MUÑOZ-JORDÁN et al., 2005). A proteína NS4A é necessária para a formação das vesículas de replicação e a NS4B está relacionada com a supressão da sinalização de IFN β e IFN γ (GUZMAN et al., 2016; MUÑOZ-JORDÁN et al., 2005). A NS5 está envolvida na síntese de RNA e no bloqueio do sistema de IFN (GUZMAN et al., 2016; MUNOZ-JORDAN; SANTIAGO, 2014).

1.4.3 Ciclo de multiplicação viral dos *Flavivirus*

O ciclo de multiplicação dos flavivirus ocorre no citoplasma da célula hospedeira. O vírus se liga à superfície da célula hospedeira através de interações entre a proteína E e receptores celulares específicos (CHAMBERS et al., 1990; KOSCHINSKI et al., 2003; LINDENBACH B., THIEL H., 2007; SELIGMAN; BUCHER, 2003). Após a ligação, a fusão e a entrada do vírus através da membrana, o que ocorre através da endocitose mediada por receptor, a acidificação da vesícula endossomal desencadeia uma mudança conformacional na proteína E, levando à fusão das membranas viral e celular, a desmontagem da partícula viral e a liberação do nucleocápsídeo no citoplasma celular (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; VON GIESEN, 2016). Uma vez liberado no citoplasma, o RNA é traduzido em uma única poliproteína, a qual é processada durante e após a tradução por proteases virais e do hospedeiro (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Após a tradução e o processamento das proteínas virais, um sítio de replicação viral é montado a partir de proteínas não estruturais virais e fatores do hospedeiro. A replicação viral se inicia com a síntese de um RNA intermediário, o qual serve como molde para a síntese do RNA genômico (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; VON GIESEN, 2016). A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). A morfogênese do vírus ocorre em associação com as membranas intracelulares (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; VON GIESEN, 2016), a montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático, quando as proteínas estruturais e o recém-sintetizado RNA brotam do lúmen do retículo endoplasmático (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). As partículas virais montadas nas vesículas possuem uma conformação de heterodímeros composta pela proteína de envelope e pela pré-membrana, o que impede a atividade de fusão da proteína do envelope (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; VON GIESEN, 2016). As partículas subvirais, virais imaturas e não infecciosas resultantes são transportadas para o complexo de Golgi através da rede trans-Golgi (TNG) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005), nas quais a acidificação induz mudanças conformacionais no vírus, expondo os sítios de clivagem da furina (SCREATON et al., 2015). Então, as partículas virais imaturas são clivadas pela protease furina do hospedeiro, dando origem às partículas maduras infecciosas. As partículas subvirais também são clivadas pela furina. (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Após a clivagem da pré-membrana no complexo de Golgi, ocorre a ativação da proteína de envelope e a fusão do vírus

com a membrana plasmática (LINDENBACH B., THIEL H., 2007; VON GIESEN, 2016). Assim, as partículas virais maduras e as subvirais são então liberadas por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 3: Ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*. O vírus se liga à superfície de uma célula hospedeira e entra na célula através de endocitose mediada pelo receptor. Ocorre a fusão das membranas viral e celular. A partícula viral é desmontada, o RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido nas membranas intracelulares. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (ER) e as partículas virais imaturas são transportadas pela rede Trans-Golgi para o complexo de Golgi, onde são clivadas pela protease furina, originando as partículas virais maduras, que são liberadas da célula por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

1.5 Manifestações clínicas

1.5.1 Manifestações clínicas – *Dengue virus*

A dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas, muitas vezes com evoluções clínicas imprevisíveis. Enquanto a maioria dos pacientes se recuperam após um curso clínico não-grave, uma pequena proporção progride para a doença grave, caracterizada principalmente por extravasamento de plasma com ou sem hemorragia. O tratamento indicado é a reidratação intravenosa, a qual pode reduzir a taxa de letalidade para menos de 1% dos casos graves. É complicado definir o grupo que progride da doença não-grave para a doença grave, mas isto é muito importante pois o tratamento apropriado pode prevenir que estes pacientes desenvolvam condições clínicas mais graves. Segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO), os pacientes com dengue não grave são divididos em dois grupos: dengue sem sinais de alarme e dengue com sinais de alarme. Os pacientes que apresentam dengue sem sinais de alarme possuem os seguintes sintomas: náuseas, vômitos, erupções cutâneas, dores, leucopenia. É importante enfatizar que mesmo estes pacientes sem sinais de alarme podem evoluir para a doença grave. Os sinais de alarme são: sensibilidade ou dores abdominais, vômitos persistentes, acúmulo de fluidos, sangramento das mucosas, letargia ou agitação, alargamento >2cm do fígado, e exame laboratorial com aumento no hematócrito concomitante com rápido decréscimo na contagem de plaquetas. Na dengue grave, os pacientes apresentam extravasamento grave de plasma, hemorragia grave e comprometimento grave dos órgãos. O extravasamento do plasma pode levar ao choque e ao acúmulo de líquido com desconforto respiratório. Os órgãos acometidos pela dengue grave são o fígado, com aumento de transaminases, o Sistema Nervoso Central (CNS), com consciência prejudicada, o coração e outros órgãos (Figura 4) (WHO, 2009a).

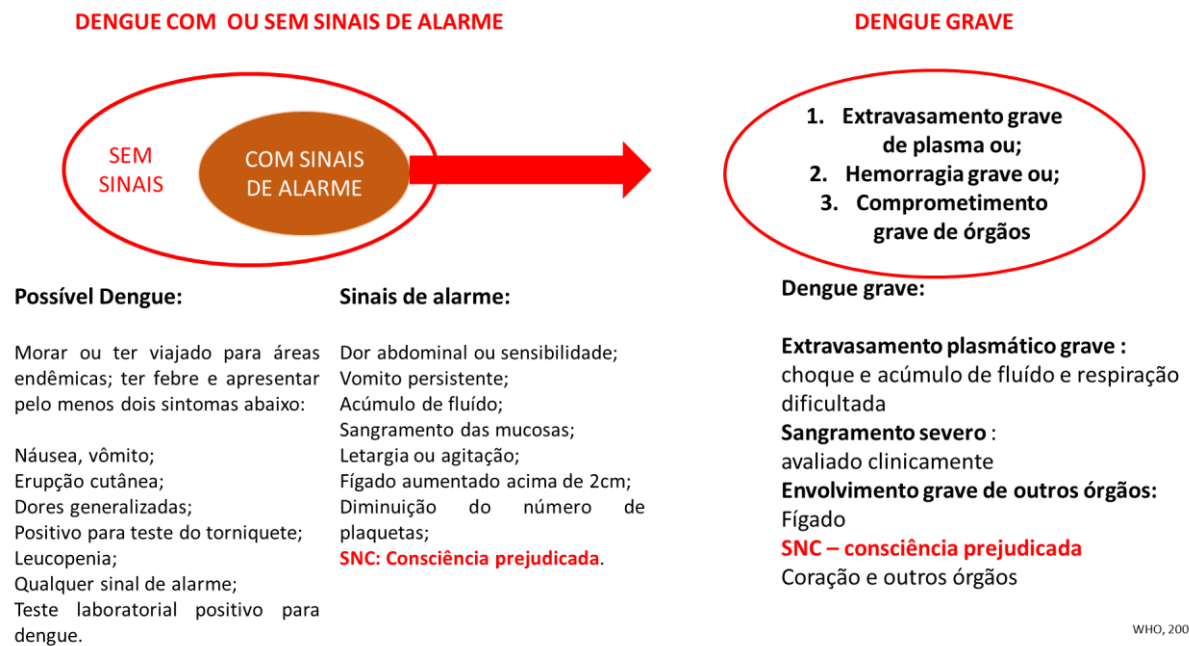


Figura 4: Sugestão de classificação de casos de dengue e níveis de gravidade (WHO, 2009a).

Após um período de incubação de 4 a 8 dias, as infecções por qualquer DENV podem produzir um amplo espectro de sintomas, com a maioria das infecções sendo assintomáticas ou subclínicas. A maioria dos pacientes se recupera após uma doença auto-limitada (embora debilitante), enquanto uma pequena proporção progride para doença grave, principalmente caracterizada por vazamento de plasma com ou sem sangramento. A doença começa abruptamente, seguida por três fases: febril, crítica e de recuperação. O período crítico ocorre em torno da defervescência, quando pode ocorrer um aumento da permeabilidade vascular acompanhado do aumento do hematócrito, levando ao choque hemorrágico, que pode resultar em prejuízo de órgãos, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada e hemorragia grave. A doença grave também inclui pacientes com hepatite, distúrbios neurológicos, miocardites e hemorragia grave sem vazamento de plasma ou choque (GUZMAN; HARRIS, 2015).

A gravidade da doença depende de vários fatores e os principais são a idade, a predisposição genética, a imunidade do hospedeiro e, naturalmente, o tipo de vírus que infectou a pessoa. É suposto que a patogênese da doença grave esteja relacionada aos mecanismos da imunidade nos quais o aumento dos anticorpos não heterotípicos e células T possuem papéis principais. Essa teoria é capaz de explicar por que o desenvolvimento da doença grave está associado a infecções

seriadas com diferentes sorotipos (SCREATON et al., 2015). Os diferentes genótipos dentro dos diferentes sorotipos também podem influenciar na virulência do isolado viral.

1.5.1.1 ADE (antibody dependent enhancement)

A infecção por qualquer sorotipo de DENV resulta em uma imunidade a longo prazo contra o sorotipo que causou a infecção (monotípica). A maioria dos anticorpos circulantes após a infecção são não-neutralizantes e são direcionados contra vários antígenos nas proteínas E e prM. Na ausência de bloqueio por anticorpos neutralizantes específicos para o sorotipo, anticorpos não-neutralizantes normalmente aumentam a entrada de qualquer sorotipo de DENV em células portadoras do receptor Fc. Este fenômeno é conhecido como ADE (do inglês, antibody dependent enhancement) e pode causar o aumento na gravidade da doença. Portanto, a dengue grave ocorre mais frequentemente em indivíduos com imunidade monotípica durante uma segunda infecção heterotípica de DENV. Casos graves podem ocorrer em infecções primárias, mas isto é pouco frequente. Em contraste, a terceira e quarta infecções por DENV são tipicamente brandas e assintomáticas (GUZMAN et al., 2016; WAHALA; DE SILVA, 2011).

Em países endêmicos, a doença grave também ocorre durante a infecção primária de crianças cujas mães são imunes contra DENV. Estas mães possuem dois ou mais anticorpos provenientes de infecções que ocorreram antes da gravidez. Dados epidemiológicos de muitos países indicam que esses anticorpos protegem crianças de dengue durante vários meses após o nascimento. Então, a concentração destes anticorpos neutralizantes maternos cai, para abaixo do limiar protetor. Assim, por um curto período, se a criança for infectada por DENV, pode ocorrer a doença grave mediada por ADE devido à presença dos anticorpos não neutralizantes maternos (GUZMAN et al., 2016).

1.5.2 Manifestações clínicas – *Zika virus*

A maioria das infecções por ZIKV são assintomáticas, apenas 18% das infecções são sintomáticas (KOOL et al., 2009), nas quais ocorre uma doença leve, auto-limitante com um período de incubação de até 10 dias, muitas vezes confundida com outras infecções por arbovírus como Dengue e Chikungunya. Os principais sintomas são febre, rash, artralgia e conjuntivite. Também podem ocorrer dor de cabeça, vômitos, edema e icterícia, sendo estes sintomas menos frequentes (ZAMMARCHI et al., 2015). Complicações digestivas como dor abdominal, diarreia e constipação, úlceras e prurido são raramente observados. A maioria dos sintomas são resolvidos espontaneamente depois de 3 a 7 dias, mas a artralgia pode persistir por um mês (FOY et al., 2011). Uma astenia pós-infecção parece ser frequente. Em qualquer caso, a doença grave que requer hospitalização tem sido incomum até agora (SAIZ, 2016).

Enquanto a maioria dos casos de infecção por ZIKV em humanos são de evolução benigna, durante a epidemia na Polinésia Francesa, foram relatados casos de complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré. Esta síndrome é uma doença auto-imune, na qual ocorrem danos ao sistema nervoso periférico com perda do isolamento de mielina resultando em mialgia, paralisia facial e disfunção muscular (HAMEL et al., 2016) e podendo provocar paralisia aguda ou subaguda, causando a morte (SAIZ, 2016). Durante este surto na Polinésia Francesa, a incidência de Guillain-Barre aumentou vinte vezes (OEHLER et al., 2014). Da mesma maneira, durante o surto na Colômbia, 86 casos de Guillain-Barre foram associados à infecção por ZIKV (SAIZ, 2016).

Recentemente, o surto de ZIKV no Brasil mostrou pela primeira vez uma possível ligação entre a infecção por ZIKV na gravidez e a microcefalia no feto (OLIVEIRA MELO et al., 2016). A microcefalia congênita é caracterizada por uma circunferência da cabeça fetal abaixo da média para a idade gestacional, resultando em retardo intelectual e deficiência física. A incidência da microcefalia congênita no Brasil aumentou drasticamente, de aproximadamente 150 casos entre 2010 e 2015, para quase o dobro durante os primeiros 9 meses de 2015. Desde então, os casos atingiram mais de 2000 em apenas alguns meses (HAMEL et al., 2016). A capacidade do ZIKV de atravessar a placenta foi demonstrada através da presença do RNA viral no líquido amniótico de uma grávida de um feto com microcefalia (OLIVEIRA MELO et al., 2016). E ainda, pesquisadores da Polinésia Francesa revisaram amostras armazenadas de líquido amniótico de casos com anomalia fetal cerebral e microcefalia, descobrindo que quatro

de cada cinco eram positivos para ZIKV (BESNARD et al., 2016). Adicionalmente, estudos mostraram a presença de ZIKV diretamente no tecido cerebral de fetos microcefálicos (DRIGGERS et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; SINGH et al., 2017). A Colômbia relatou mais de 5000 casos de ZIKV em mulheres grávidas e, até 2016, com um caso documentado de microcefalia em recém-nascido, e outros dois com anormalidades congênicas de cérebro (BUTLER, 2016). E também, muitos modelos murinos forneceram evidências cruciais que confirmam a relação entre ZIKV e microcefalia fetal. Todos estes estudos concluíram que o ZIKV é um agente causador de microcefalia (SINGH et al., 2017).

Além da microcefalia, a possível relação entre infecção por ZIKV e hidropsia fetal e morte fetal tem sido relatado recentemente no Brasil (GOURINAT et al., 2015). Essas infecções congênicas relacionadas com a infecção por ZIKV, também foram associadas a um aumento nos achados que ameaçam a visão, que incluem lesões maculares e perimaculares bilaterais, bem como anormalidades do nervo ótico (DE PAULA FREITAS et al., 2016; VENTURA et al., 2016).

1.6 Transmissão e Epidemiologia

1.6.1 Transmissão e Epidemiologia – *Dengue virus*

Os DENVs são mantidos em um ciclo endêmico-epidêmico envolvendo seres humanos e mosquitos em centros urbanos tropicais superpopulosos. Estes vírus são totalmente adaptados aos seres humanos e o principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, altamente urbanizado, emergiu há muito tempo dos ciclos silvestres, envolvendo os primatas não humanos e os mosquitos *Aedes* nas florestas tropicais da Ásia e da África. Embora estes ciclos ainda existam, sua importância para a saúde pública é incerta (GUZMAN et al., 2016).

Os vírus da dengue são mantidos principalmente em um ciclo humano-mosquito-humano (Figura 5). O principal vetor, o mosquito *Ae. aegypti*, é altamente adaptado às habitações humanas. O *Aedes albopictus* também pode sustentar a transmissão do DENV em humanos. Outras espécies mantêm um ciclo macaco-mosquito no sudeste asiático e na África Ocidental. A transmissão do vírus de primatas não humanos para humanos parece ser rara (LIMKITTIKUL; BRETT; L'AZOU, 2014; WHO, 2016).

O *Ae. Aegypti* foi introduzido nas Américas durante o tráfico de escravos no século XVII e se espalhou para o mundo inteiro à medida que a indústria de navegação se expandia. Esta espécie vive em íntima associação com os humanos e se alimenta do sangue deles, repousa em suas casas e coloca seus ovos em recipientes de água feitos pelos humanos. A média de vida da fêmea deste mosquito é de aproximadamente uma semana, mas algumas podem viver aproximadamente duas semanas (GUZMAN et al., 2016).

A fêmea do mosquito é infectada quando ela se alimenta do sangue de uma pessoa que está na fase virêmica e febril aguda da Dengue. Durante o período de incubação extrínseco, o vírus infecta primeiramente as células do intestino médio e, depois, se dissemina para se replicar em numerosos tecidos de mosquito, infectando finalmente as glândulas salivares de 5 a 12 dias após a infecção. Este processo é influenciado pela temperatura, pelo próprio vírus e pela competência do mosquito. Quando as glândulas salivares estão infectadas, o mosquito está infeccioso e capaz de transmitir o vírus para outra pessoa durante o repasto sanguíneo (Figura 5). O mosquito permanece infeccioso por toda sua vida e pode infectar qualquer pessoa na qual ele se alimenta. Também pode ocorrer a transmissão vertical da fêmea dos mosquitos para seus ovos (GUZMAN et al., 2016).

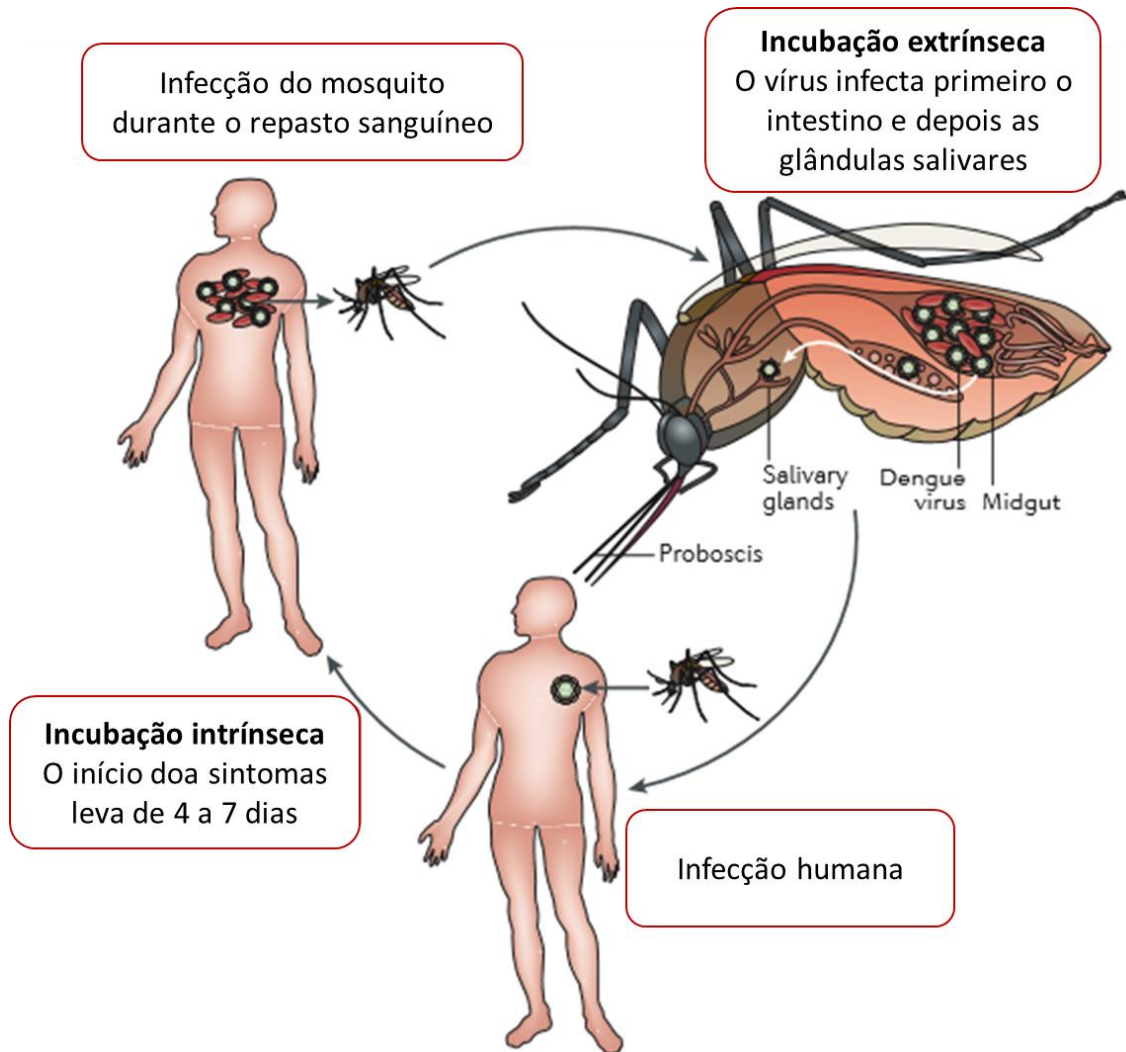


Figura 5: Ciclo de transmissão da Dengue. O mosquito se torna infectado quando se alimenta do sangue de uma pessoa na fase virêmica da doença. Durante a fase extrínseca do ciclo, os vírus infectam as células do intestino do mosquito e outros tecidos e só depois são disseminados para as glândulas salivares. Um mosquito infectado pode transmitir o vírus para várias pessoas enquanto se alimenta. Após a infecção da pessoa, demora aproximadamente 4 a 7 dias para os sintomas aparecerem e para a pessoa se tornar capaz de transmitir o vírus para outros mosquitos (GUZMAN et al., 2016 - adaptado).

Embora os DENVs tenham alcançado a distribuição ao longo dos trópicos nos séculos XVIII e XIX, durante os séculos XX e XXI, a globalização permitiu a sua disseminação mais rápida e a introdução dos vários sorotipos virais em áreas permissivas, tornando a maioria das áreas tropicais hiper-endêmicas, ou seja, com a co-circulação dos vários sorotipos virais. Esta rápida propagação começou com uma pandemia de dengue no Sudeste Asiático, na década de 1950, a qual foi associada com a economia regional e o crescimento urbano após a Segunda Guerra Mundial. A epidemia acelerou ainda mais nos anos 1970 e 1980, levando a uma expansão geográfica global do vírus e dos mosquitos vetores, e, conseqüentemente, na difusão da transmissão de DENV nas regiões tropicais e subtropicais (GUZMAN et al., 2016;

HALSTEAD, 1992). Os quatro sorotipos do DENV e os mosquitos vetores estão agora presentes em todo o trópico e sub-trópico em todo o mundo (KRAEMER et al., 2015; MESSINA et al., 2014; SHARP et al., 2017).

Dados de vigilância do Sudeste Asiático (OOI; GUBLER, 2009) e na América (SAN MARTÍN et al., 2010) demonstram epidemias de dengue mais longas e mais frequentes, com aumento também da morbidade e mortalidade relacionados à doença (SHARP et al., 2017). A incidência recente de dengue aumentou muito, tendo praticamente dobrado a cada década desde 1990. A maior incidência da dengue ocorre na Ásia (GUZMAN et al., 2016). A dengue aumentou substancialmente na África, embora a falta de suporte clínico e de teste de diagnóstico provavelmente subestimaram a prevalência de dengue no passado (STANDISH et al., 2010). Também houve aumento no surto de dengue na Índia e em regiões do Mediterrâneo Oriental, com recentes relatos de casos no Paquistão, Arábia Saudita, Sudão, Iêmen e Madagascar. Também foram relatados casos de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue e a circulação de vários sorotipos (STANDISH et al., 2010). E ainda, foram relatados casos de dengue no Havaí, nas ilhas Galápagos, na Ilha de Páscoa, em Hong Kong e em Buenos Aires. Além de relatos da introdução da doença na Flórida, no sudeste da França e na Ilha da Madeira (WHO, 2009; ALVES et al., 2013). A presença dos mosquitos vetores *A. albopictus* e *A. aegypti* na Europa, em conjunto com o aumento de viagens e da introdução de patógenos, representam risco para a transmissão (JENSENIUS et al., 2013). Esta expansão geográfica resultou no aumento da frequência e da magnitude das epidemias e no aumento da frequência da doença grave (GUZMAN et al., 2016). Os viajantes desempenham um papel importante na epidemiologia global da dengue, transportando vírus de uma região para outra (WHO, 2009; JENSENIUS et al., 2013).

No Brasil, em 2015, foram registrados 1.688.688 casos prováveis de dengue, 1.714 casos de dengue grave, 21.693 casos de dengue com sinais de alarme e 986 óbitos. Em 2016, foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue, 861 casos de dengue grave, 8.402 casos de dengue com sinais de alarme e 642 óbitos. Em 2017, até 28/01/2017, foram registrados 21.174 casos prováveis de dengue no país, e outros 5.595 casos suspeitos foram descartados, sendo que a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (9.021 casos) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (3.796 casos), CentroOeste (3.577 casos), Sul (2.407 casos) e Norte (2.373 casos). A análise da taxa de incidência de casos prováveis de dengue (número de casos/100 mil hab.), segundo regiões geográficas, demonstra que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 23,2 casos/100 mil hab. e 13,6

casos/100 mil hab., respectivamente. E ainda, até esta mesma data de 2017, foram confirmados 4 casos de dengue grave, 77 casos de dengue com sinais de alarme e 2 óbitos, um no estado do Mato Grosso e o outro em Goiás, e 12 óbitos estão em investigação (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA, 2017a, 2017b)

No final dos anos 80, o número de relatos de sorotipos diferentes em uma única área começou a aumentar, à medida que foram desenvolvidos testes de diagnóstico sorotipo específicos mais acessíveis. O que pode explicar os aumentos nos relatórios globais dos sorotipos específicos de DENV neste momento, embora o número de sorotipos de DENV relatados tenha desde então, continuado a aumentar em muitas áreas em toda a América Latina e Caribe, assim como no Sudeste Asiático, no subcontinente indiano, Indonésia e Austrália. Isto é notável no mapa da figura 6, nos anos 2000-2013, no qual a maioria dos estados brasileiros assim como o México, Índia e Indonésia reportaram a presença de todos os sorotipos de DENV. Embora algumas áreas da África tenham relatado a presença dos quatro sorotipos, muitas áreas reportarem a presença de três sorotipos (SHARP et al., 2017).

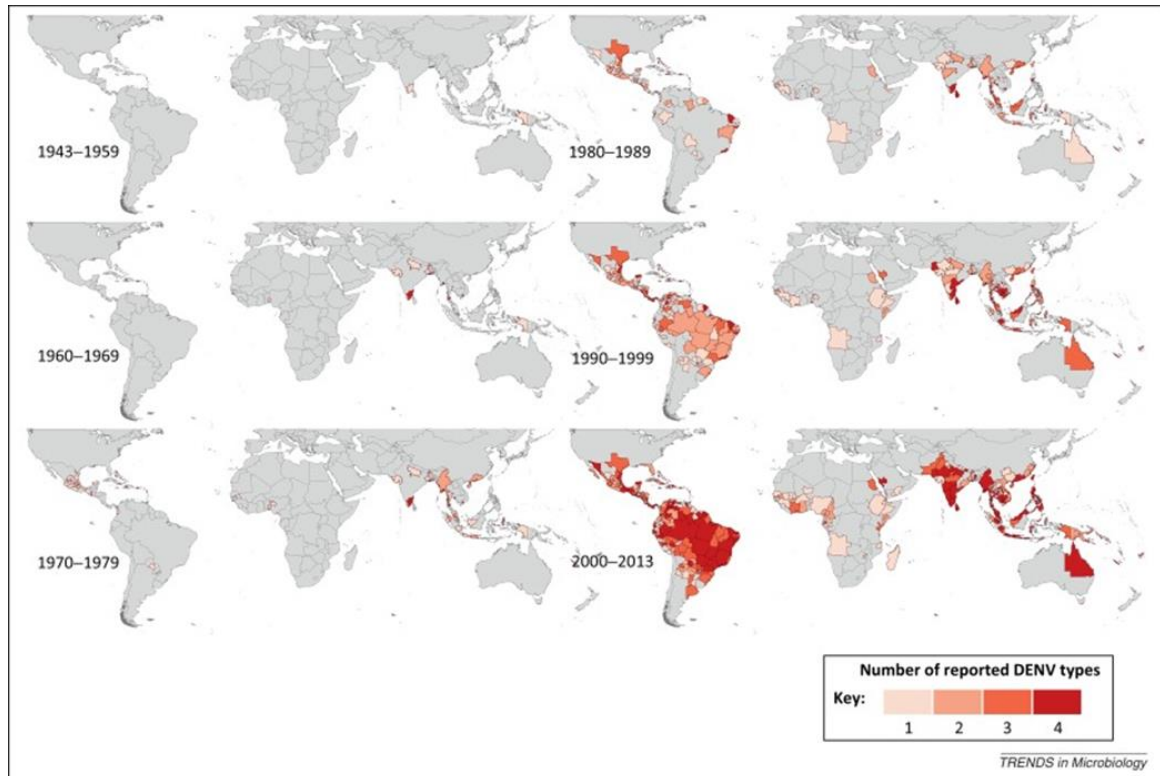


Figura 6: Co-circulação mundial dos quatro sorotipos de DENV. Número acumulado de sorotipos de DENV relatados por década desde 1943 a 2013 (SHARP et al., 2017).

A disseminação de vetores seguida da urbanização e do declínio nos esforços de controle de vetores contribuem para o aumento da incidência das infecções por dengue. No entanto, a dengue não se limita aos ambientes urbanos e é cada vez mais relatada nas áreas rurais. Além disso, fatores como crescimento populacional, globalização e viagens, e mudanças climáticas facilitam a transmissão de vírus da dengue. A dengue exibe variabilidade temporal e geográfica substancial (LIMKITTIKUL; BRETT; L'AZOU, 2014; WHO, 2016).

1.6.2 Transmissão e Epidemiologia – *Zika virus*

A transmissão do ZIKV também ocorre durante o repasto sanguíneo de mosquitos do gênero *Aedes*. Mesmo que a picada de mosquito seja o principal modo de transmissão, alguns casos de infecção não-vetorial também foram relatados, como a transmissão perinatal (BESNARD et al., 2014), provavelmente através do cruzamento da placenta pelo vírus ou durante o parto de mães virêmicas. Embora o vírus tenha sido detectado no leite materno, ainda não existem evidências sobre a possibilidade de transmissão por esta rota (HAMEL et al., 2016). A transmissão por transfusão sanguínea ainda não foi demonstrada, mas o potencial risco desta transmissão não

pode ser excluído (MUSSO et al., 2014). O genoma viral foi detectado na saliva (MUSSO et al., 2015a) e na urina (GOURINAT et al., 2015). E ainda, um caso de transmissão sexual foi relatado nos Estados Unidos (FOY et al., 2011) e foi demonstrada presença do vírus no sêmen de um paciente infectado na Polinésia Francesa (MUSSO et al., 2015b).

Desde o primeiro isolamento de ZIKV em 1954 de um nativo da Nigéria (MACNAMARA, 1954), muitos estudos sorológicos e entomológicos reportaram a circulação de ZIKV em uma ampla área da África, incluindo Quênia, Nigéria, Serra Leoa, Uganda, República Africana Central, Senegal e Costa do Marfim, com prevalência variando entre 1,3 a 52% (SAIZ, 2016). Na Ásia, nos anos de 1950, a soroprevalência de ZIKV em humanos foi reportada em vários países: Índia, Malásia, Vietnã, Filipinas e Tailândia, com prevalência variando entre 8 a 75%. Com o passar do tempo, outros países foram reportando casos de soroprevalência em humanos, como a Indonésia, em 1977 e 1978, e o Paquistão, em 1980. Mais recentemente, alguns casos humanos esporádicos foram relatados como um caso confirmado em Camboja, em 2010 (HEANG et al., 2012), um viajante infectado que retornou da Indonésia, em 2013 (KWONG; DRUCE; LEDER, 2013), e alguns muitos casos positivos de viajantes que retornaram da Tailândia, durante 2012 a 2014 (BUATHONG et al., 2015). Mais recentemente em janeiro de 2016, a WHO notificou um caso de infecção por ZIKV em um viajante que retornava para Finlândia após passar alguns meses nas Maldivas (SAIZ, 2016). Na Oceania, em abril de 2007, um surto de ZIKV foi relatado nas Ilhas Yap, Micronésia. Ainda não é conhecido como o vírus foi introduzido, mas foi proposto que isto ocorreu através de um mosquito infectado ou de uma pessoa assintomática com infecção não detectada (KOOL et al., 2009).

Após a detecção do primeiro caso de ZIKV na Polinésia Francesa em outubro de 2013, durante o surto, até 11% da população foi afetada. A maioria dos casos clínicos apresentou febre baixa, astenia, artralgia no pulso e dedos, cefaléia, erupção cutânea, e apenas um paciente apresentou Síndrome de Guillain-Barré, 7 dias após o diagnóstico laboratorial de ZIKV. Vale ressaltar que, após este surto, a incidência da Síndrome de Guillain-Barre na Polinésia Francesa aumentou 20 vezes (OEHLER et al., 2014). As razões para este aumento ainda não são conhecidas. Análises deste ZIKV circulante mostraram que ele é relacionado geneticamente com os ZIKV das Ilhas Yap em 2007 e com o ZIKV de Camboja, os quais não foram associados a um número considerável de casos de Guillain-Barre. Após o surto da Polinésia Francesa no final de 2013, surtos subsequentes ocorreram em Nova Caledônia, Ilha Oriental e nas Ilhas Cook. Na Austrália, o primeiro caso de infecção por ZIKV foi notificado em 2012 em um viajante retornando da Indonésia. Desde então, todos os casos foram importados de países

afetados pelo vírus. Mas a presença do vetor *Ae. aegypti* neste país, evidencia o risco de transmissão local (SAIZ, 2016).

No início de 2015, foi relatada a primeira transmissão autóctone de ZIKV no Brasil e, desde então, o vírus tem se espalhado pela América (ZANLUCA et al., 2015). A partir desta data, 29 países ou territórios da América também relataram casos autóctones de infecção por ZIKV: Aruba, Barbados, Bolívia, Bonaire, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Curaçao, República Dominicana, El Salvador, Guiana Francesa, Guiana, Guadeloupe, Guatemala, Haiti, Honduras, Jamaica, Martinica, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Porto Rico, São Martinho, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela e Ilhas Virgens. E ainda, estão aparecendo casos de infecção por ZIKV nos Estados Unidos e Canadá. Já na Europa, não há evidência de infecção autóctone por ZIKV. Todos os casos relatados foram importados de pessoas retornando de países endêmicos (SAIZ, 2016).

Segundo o relatório com a atual situação do ZIKV no mundo, publicado pela WHO, em janeiro de 2017, 76 países ou territórios notificaram evidências de transmissão de ZIKV desde 2007, no qual: 59 países com surtos notificados a partir de 2015; 7 com a possibilidade de transmissão endêmica ou com a evidência de infecções locais transmitidas por mosquito em 2016 ou 2017; 10 com evidência de infecções locais de ZIKV transmitidas por mosquitos em ou antes de 2015; 13 países notificaram evidência de transmissão de pessoa para pessoa; 29 países ou territórios relataram microcefalia e outras malformações do SNC potencialmente associadas à infecção pelo ZIKV ou sugestivas de infecção congênita; 21 países ou territórios relataram um aumento da incidência de Guillain-Barre e/ou confirmação laboratorial de uma infecção por ZIKV entre os casos de Guillain-Barre.

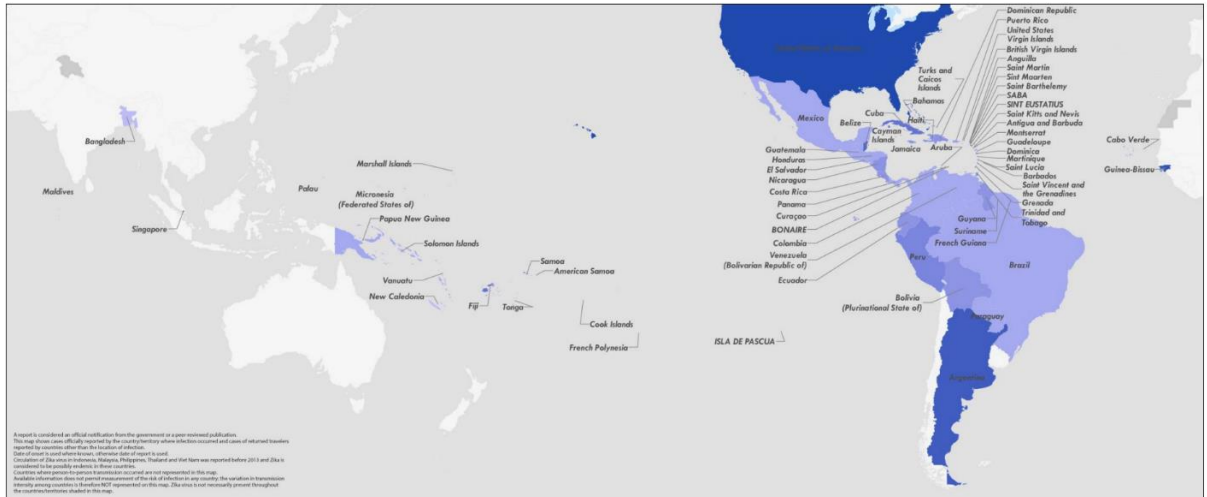


Figura 7: Países onde foi detectada infecções por ZIKV transmitidas por mosquito (WHO, 2017).

1.7 Patogênese e Resposta imune

1.7.1 Patogênese e Resposta imune – *Dengue virus*

O *Dengue virus* infecta principalmente células imunes de linhagem mielóide, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, e possivelmente hepatócitos e células endoteliais (GREEN et al., 2014). Ainda não há um único receptor definido necessário para a entrada do vírus, mas foram propostos diversos receptores do hospedeiro que possuem papel importante na ligação do vírus à célula alvo, incluindo glicosaminoglicanos como heparan sulfato e lectinas, molécula de adesão das células dendríticas (DC-SIGN), receptor de manose de macrófagos, o receptor lipopolissacarídeo (LPS) CD14, proteínas induzidas por estresse como heat shock 70kDa (HSP70) e 90kDa (HSP90) (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015), domínio mucina e imunoglobulina de células T (TIMs), receptor proteína tirosina quinase TAM e laminina (SCREATON et al., 2015). E ainda, durante uma segunda infecção com um sorotipo diferente da primeira, células que expressam o receptor Fc podem promover a entrada do vírus através do ADE. Como já explicado, durante esse processo, anticorpos reativos derivados da primeira infecção se ligam ao sorotipo diferente da segunda infecção, formando um complexo imune que é reconhecido pelo receptor Fc, o qual possibilita a entrada do vírus (GREEN et al., 2014).

A existência de vários receptores sugere que o vírus não utiliza um único receptor específico para entrar na célula, ao contrário, ele reconhece e se liga a diversas moléculas, de acordo com a variedade de tipos celulares que são susceptíveis à infecção, tanto no hospedeiro humano como no mosquito. Realmente, o DENV precisa ser competente para infectar organismos completamente distintos como os hospedeiros já citados. E ainda, dentro do hospedeiro, o vírus é capaz de infectar uma grande variedade de tipos celulares completamente diferentes. Todos esses fatos sugerem que o DENV pode ter evoluído para não ter uma célula alvo ou órgãos específicos, mas para ser não-específico, aumentando a variedade de alvos. Isto reflete, *in vivo*, em uma vasta disseminação do vírus no organismo hospedeiro, levando a uma ampla variedade de manifestações da doença, que são vistas em pacientes infectados com DENV (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015).

Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como receptores do tipo Toll (TLRs), particularmente TLR3, TLR7 e TLR8, e sensores intracelulares, como RNA helicases, são a

primeira linha de defesa da resposta imune inata para o reconhecimento de RNA de fita dupla (dsRNA), RNA de fita simples (ssRNA) ou RNA modificado. O principal TLR envolvido no reconhecimento do DENV é o TLR3, que reconhece o RNA viral após a acidificação endossomal (Figura 8– Etapa A), e já foi demonstrado que este reconhecimento induz a produção de IL-8 e de Interferon α/β (IFN- α/β) *in vitro*. O reconhecimento do RNA de DENV resulta na fosforilação da molécula adaptadora TRIF (do inglês TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon β), a qual interage com os fatores associados ao receptor de TNF TRAF3 e TRAF6. TRAF3 interage com TBK1 e Ik kinase 1 (Ikk1), resultando na fosforilação do IRF3. TRAF6, através da associação com TAK1, ativa AP-1 e inicia a fosforilação de I κ B, levando à translocação nuclear de NF κ B. A translocação de IRF 3, AP-1 e NF κ B para o núcleo induz a produção de IFN- α/β , de genes estimulados por IFN (ISGs) e de quimiocinas. Experimentos em primatas não humanos infectados com dengue demonstraram que a administração de agonistas de TLR3 e TLR7/TLR8 resultaram na redução significativa de replicação viral e no aumento de quimiocinas pro-inflamatórias, assim como nos títulos de anticorpos anti-DENV no soro, o que indica o papel protetor dos TLRs durante a infecção pelo DENV (GREEN et al., 2014).

Em conjunto com os TLRs, helicases citoplasmáticas percebem o RNA no citoplasma. Tanto o gene I indutor de ácido retinóico (RIG-I) quanto o gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5), os quais reconhecem dsRNA, são induzidos durante a infecção por DENV e estão envolvidos na indução de IFN- β (Figura 8 – Etapa B). Um importante papel desses sensores citoplasmáticos de dsRNA é a distinção entre o RNA viral e o RNA da célula hospedeira. RIG-1 e MAD5 sinalizam através da proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS), a qual interage com a proteína do retículo endoplasmático rugoso, estimulatória de genes de IFNs (STING). Uma vez ativada, MAVS oligomeriza e atrai múltiplas ubiquitinas ligases E3 como TRAF3 e TRAF6, para ativar a cascata de sinalização. A ativação de TRAF3 resulta na translocação para o núcleo de IRF3 e IRF7, os quais induzem a transcrição de IFN- α/β , como já descrito. Além disso, a ativação de TRAF6 resulta na translocação do NF κ B para o núcleo e na produção de IFN- α/β . Foi mostrado que ambos RIG-1 e MDA5 sinergizam com TLR3 para limitar a replicação de DENV *in vitro* (GREEN et al., 2014).

A secreção de IFN- α/β pelas células infectadas pelo vírus dispara sinais de alerta para as células adjacentes, sinalizando que está ocorrendo uma infecção, e também induz uma resposta antiviral celular autócrina. IFN- α/β são poderosos inibidores da infecção por DENV. Estes interferons sinalizam através dos receptores de IFN- α/β (IFNAR) e ativam a via JAK/STAT

através da fosforilação das moléculas adaptadoras TYK2 e JAK1. A ativação dessas moléculas adaptadoras resulta na fosforilação e dimerização de vários transdutores de sinal e na ativação de moléculas de transcrição (STAT), incluindo STAT1, STAT2, STAT3 e STAT5. Um importante complexo de sinalização formado por STAT1 e STAT2 junto com IRF9 em resposta à ativação pelo IFNAR, é o gene do complexo do fator 3 estimulador de interferon. Este complexo se transloca para o núcleo e se liga a elementos de resposta estimulados por IFN, localizados na região promotora dos genes estimulados por IFN, induzindo a produção de numerosas proteínas antivirais e citocinas pro-inflamatórias. A sinalização do IFNAR também induz cascatas de sinalização alternativas, incluindo a cascata da proteína quinase p38 e a cascata da quinase fosfatidilinositol 3, as quais resultam na produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (GREEN et al., 2014).

Além da produção de IFN- α/β , a translocação do NF κ B para o núcleo induz a produção de pro-interleucina 1 e a ativação do inflamassomo, o que resulta na produção de Interleucina 1 e 18. Estas citocinas são importantes na resposta antiviral e resultam no recrutamento de células imunes para o local da infecção (GREEN et al., 2014).

Adicionalmente, pequenos RNAs como micro RNAs (miRNAs) são utilizados pelas células hospedeiras para controlar a expressão gênica em resposta à infecção viral (Figura 8 – Etapa C). Os miRNAs são processados e interagem com proteínas na via de RNA de interferência (iRNA), como Dicer, Drosha, Argo 1 e Argo 2. Interessantemente, nocautes dessas proteínas em células de mamífero durante infecção com DENV, resultam no aumento da replicação viral, indicando que a via de iRNA pode desempenhar um papel importante na resposta celular anti-DENV. Os miRNAs regulam a sinalização de TLR e IL-1 e também são induzidos em resposta a esses sinais durante a infecção viral, promovendo o controle da resposta imune inata do hospedeiro (GREEN et al., 2014).

De maneira geral, o RNA do DENV é reconhecido pelos receptores de reconhecimento padrão TLR3 (Figura 8 – Etapa A), MDA-5 e RIG-1 (Figura 8 – Etapa B), resultando em uma cascata de sinalização que induz a produção de IFN- α/β . A infecção viral também induz a via de iRNA do hospedeiro (Figura 8 – Etapa C) para controlar a replicação viral, causar a hipertrofia do ER (onde a tradução e replicação viral ocorrem) (Figura 8 – Etapa D) e estimular a autofagia (Figura 8 – Etapa E), a fim de balancear o estresse celular e prevenir a apoptose (GREEN et al., 2014).

Um subconjunto da proteína NS1 de DENV adquire glicosilfosfatidilinositol (GPI) da célula hospedeira, utilizando a via de ligação de GPI das células. Esta NS1 ancorada por GPI é então transportada para a membrana celular (GUZMAN et al., 2016; JACOBS et al., 2000). O TLR (TLR2 ou TLR4) é capaz de reconhecer GPI e, portanto, poderia reconhecer as células infectadas por DENV que expressam em sua membrana a forma da proteína NS1 ancorada por GPI.

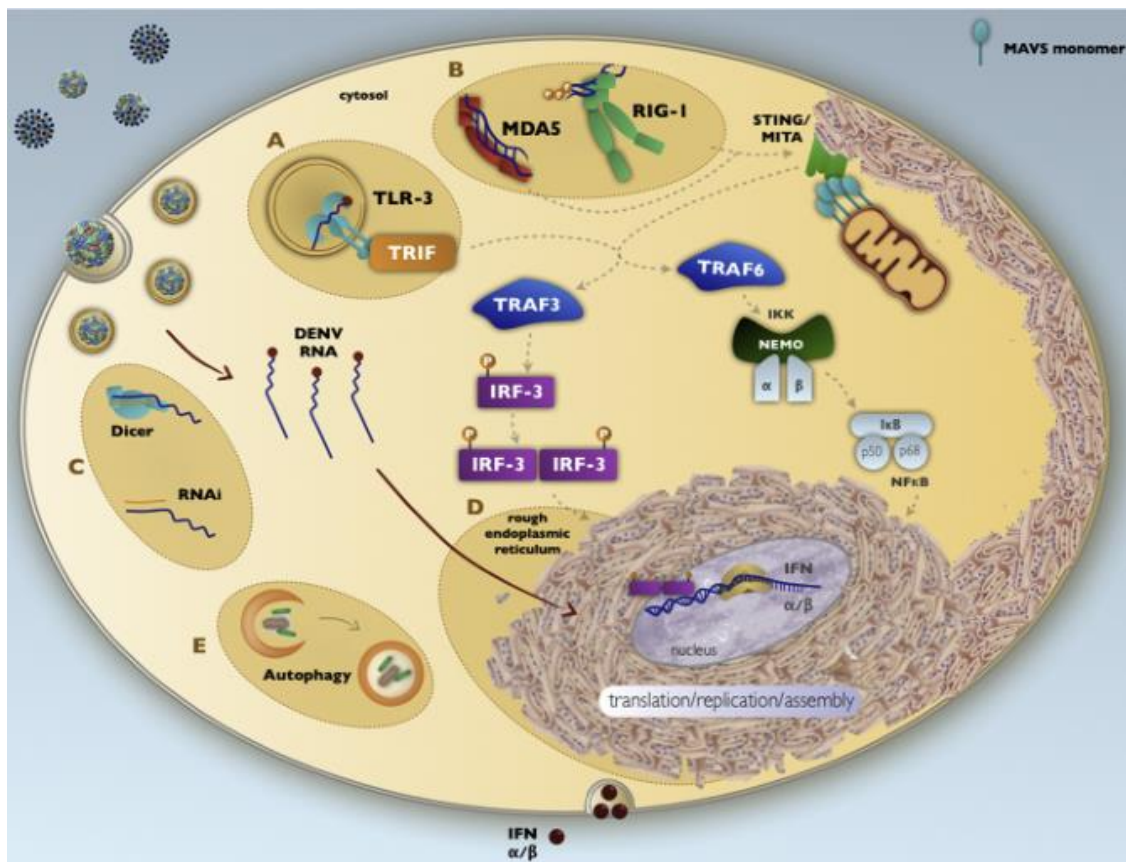


Figura 8: Resposta imune inata do hospedeiro contra a infecção por *Dengue virus*. O RNA de DENV é reconhecido por TLR 3 (A) e por MDA5 e RIG-1 (B), resultando em uma cascata de sinalização que induz a produção de IFN α/β . A infecção viral induz a via de iRNA do hospedeiro (C), para controlar a replicação do RNA viral; Hipertrofia do ER (D), onde ocorre a tradução e a replicação viral, e autofagia (E) para balancear o estresse celular e prevenir a apoptose (GREEN et al., 2014).

1.7.1.1 Evasão da resposta imune pelo Dengue virus

Existem várias observações importantes que sugerem o papel da resposta imune na patogênese da dengue: primeiro, a dengue grave normalmente, mas não exclusivamente, ocorre durante uma segunda infecção. Segundo, o auge dos sintomas ocorre quando as cargas virais estão diminuindo rapidamente, o que implica que a imunopatologia pode ser conduzida como uma consequência do controle viral. Terceiro, os altos níveis de carga viral ou de NS1 solúvel em paciente com dengue hemorrágica predisõem a aumentar a gravidade da doença, que se manifesta quando o vírus é controlado e a carga viral cai. E por último, o pico dos sintomas, o extravasamento vascular e o controle viral coincidem com a tempestade de citocinas, a qual é caracterizada por altos níveis circulantes de muitos mediadores pro-inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF), receptor 1 do TNF solúvel (sTNFR1), sTNFR2, Interferon γ (IFN γ), ligante 8 da quimiocina CXC (CXCL8), CXCL9, CXCL10, CXCL11, ligante 5 da quimiocina CC (CCL5) e o fator A de crescimento endotelial vascular (VEGFA), assim como da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10) (SCREATON et al., 2015).

A resposta imune inata possui papel importante na patogênese da dengue. Estudos mostram que o DENV evoluiu para evadir da resposta imune do hospedeiro de duas formas distintas: sequestro e subversão da resposta imune inata (Figura 9). A infecção por DENV nas células hospedeiras causa amplo rearranjo das membranas celulares, no entanto, o vírus precisa controlar os mecanismos imunes inatos como o estresse, que leva à morte celular. O vírus manipula a célula para manter o metabolismo do hospedeiro e a produção de proteínas, enquanto as sequestra em vesículas que não são degradadas pelos lisossomos do hospedeiro. Este processo complexo envolve um equilíbrio delicado entre a ativação das vias celulares para a expansão do ER e a indução do metabolismo lipídico, e a prevenção da morte induzida por estresse do ER. O aumento do ER ocorre devido a ação das proteínas não estruturais NS2B/NS3, que induzem a proteína 1 ligada ao X-box, levando à expansão do ER para a replicação viral. A indução desta proteína também resulta na redução da resposta da proteína desdobrada (do inglês UPR) e dos efeitos citopáticos induzidos por DENV, indicando que a redução da UPR pode prevenir ou retardar a morte celular durante a infecção (GREEN et al., 2014).

DENV também usa as vias de regulação da própria célula, como a autofagia, para facilitar a replicação. A autofagia é uma degradação lisossomal dos conteúdos citoplasmáticos, e é parte

da reciclagem celular habitual das macromoléculas e da resposta do hospedeiro a estresse. Este mecanismo também está envolvido na resposta imune inata, causando a morte de células infectadas por patógenos. Um aspecto crucial da via de autofagia é a formação de vesículas citossólicas de membrana dupla, os autofagossomos, os quais engolfam porções de materiais citoplasmáticos e facilitam a fusão com os lisossomos. *Dengue virus* é capaz de ativar a maquinaria de autofagia, aumentando a formação dos autofagossomos juntamente com o aumento da replicação viral. O vírus também inibe a fusão dos autofagossomos com os lisossomos, evitando a degradação lisossomal (GREEN et al., 2014).

Além disso, as proteínas não estruturais do *Dengue virus* atuam diretamente nos componentes das cascatas de sinalização da resposta imune inata, inibindo a via iRNA. Isto ocorre através de dois mecanismos distintos, envolvendo NS4B e o RNA subgenômico de flavivirus (sfRNA). A proteína não estrutural NS4B interfere diretamente na habilidade da proteína Dicer de processar RNAs pequenos. E o sfRNA inibe a clivagem de dsRNA pela proteína Dicer, através da ligação e saturação da RNase. De uma maneira dose-dependente, o aumento na concentração de sfRNA inibe a clivagem de dsRNAs longos em siRNAs. Adicionalmente, sfRNA interage diretamente com a exonuclease do hospedeiro XRN1, aumentando a estabilidade do RNA mensageiro dentro da célula hospedeira, o que pode beneficiar o RNA viral (GREEN et al., 2014).

Durante uma segunda infecção por DENV, o vírus pode infectar células que possuem o receptor Fc via ADE. Vários experimentos *in vitro* mostraram que monócitos humanos infectados por DENV em condições de ADE, possuem seu estado antiviral inato comprometido. Especificamente, a absorção do DENV em complexo com anticorpos anti-DENV, através dos receptores FcγRI e FcγRIIa em células THP-1 monocíticas, resultou no aumento da infecção, através da sub-regulação da expressão de genes de TLRs, de reguladores negativos da via de NFκB, e da perturbação das cascatas de sinalização de RIG-I e MDA5, conduzindo a uma diminuição da resposta imune inata e aumento da replicação viral. Além disso, a infecção por DENV através de ADE aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, nas células dendríticas (GREEN et al., 2014).

Adicionalmente, as proteínas não estruturais de DENV bloqueiam a indução e a sinalização de IFNα/β através de várias vias distintas. O vírus inibe a produção dos IFNs tipo I através do complexo proteico NS2B/NS3, que marca a molécula adaptadora STING para degradação. Esta molécula normalmente promove a fosforilação do fator de transcrição IRF3, o qual ativa o

promotor de IFN- β . É importante ressaltar que o complexo NS2B/NS3 cliva a STING humana e não a de camundongo. DENV também inibe a via de sinalização de IFNs tipo I, que reduz a expressão direta de inibidores ISGs, mas o exato mecanismo pelo qual o vírus é capaz disto permanece incerto. A expressão de NS4B impede a fosforilação de STAT1, possivelmente pela inibição da fosforilação de Tyk2, uma molécula upstream à ativação do STAT1. A expressão de NS5 está relacionada a uma perda na expressão de STAT2, a qual também é necessária para a sinalização de IFN tipo I. Novamente, é importante ressaltar que a degradação de STAT2 é hospedeiro-específica, já que NS5 promove a degradação da STAT2 humana mas não da STAT2 murina (DIAMOND; PIERSON, 2015).

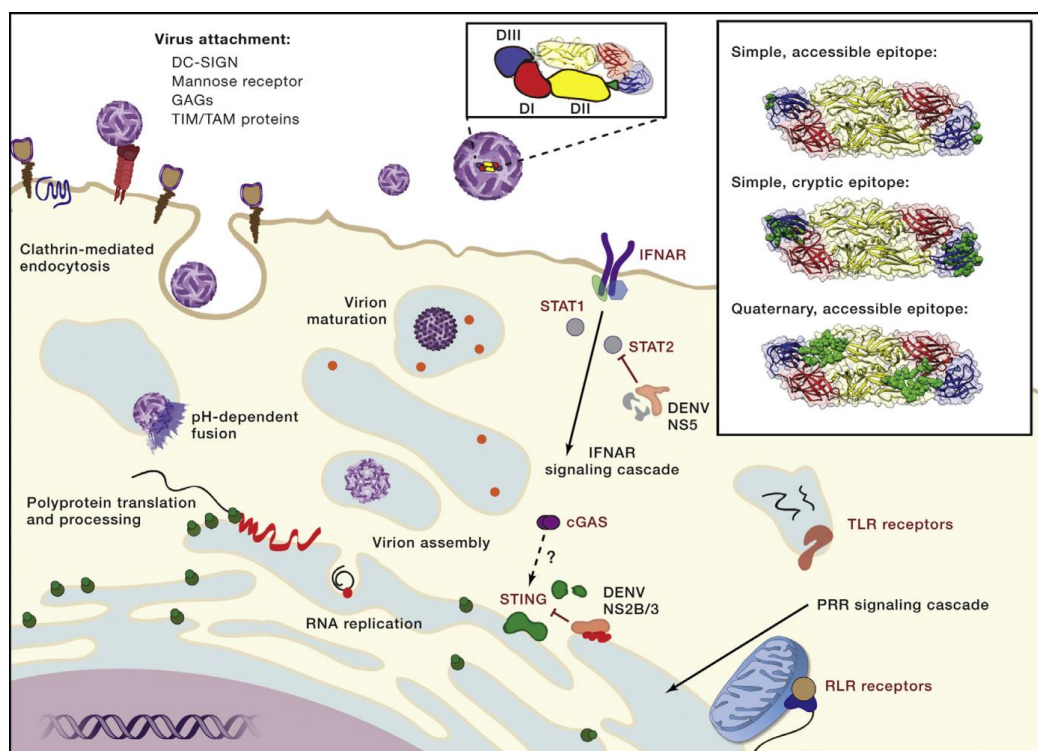


Figura 9: Mecanismos de evasão e subversão da resposta imune utilizados por DENV. DENV interage com as células alvo através de um ou mais fatores do hospedeiro. (DIAMOND; PIERSON, 2015). Então, o vírus é internalizado por endocitose e funde com as membranas do endossomo. A ligação do vírus e a fusão da membrana são orquestradas pela proteína do envelope (E), a qual é composta por três domínios (no topo e centro da figura; DI, em vermelho; DII, em amarelo; DIII, em azul). A tradução e replicação do RNA viral ocorrem em associação com as membranas do retículo endoplasmático (ER). Durante a liberação, o vírus entra em estágio de maturação, definido pela clivagem da proteína prM pela protease furina (esferas laranjas). A infecção é detectada por receptores de reconhecimento padrão do hospedeiro que se ligam às moléculas de RNA viral, incluindo TLRs e receptores do tipo RIG-1 (RLRs). Adicionalmente, DENV ativa os sensores de RNA cGAS e a via de STING através de mecanismos desconhecidos. Este sistema de defesa estimula a produção de IFNs e promove a expressão de ISGs. DENV desenvolveu mecanismos, incluindo a clivagem de STING mediada por NS2B/3 e a degradação de STAT2 mediada por NS5, para antagonizar a resposta antiviral.

Resumidamente, DENV subverte a resposta imune antiviral, sequestrando-a e manipulando a maquinaria celular e as vias de sinalização. O vírus controla os processos celulares para atrasar a morte celular, inibir a via iRNA, e fornecer um nicho escondido dos sensores de RNA inatos intracelulares. E ainda, as proteínas não estruturais de DENV inibem a indução e a cascata de sinalização de IFN- α/β , impedindo as vias celulares que levam à expressão dos genes de resposta a interferon e mecanismos antivirais (GREEN et al., 2014).

1.7.2 Patogênese e Resposta imune – *Zika virus*

Embora exista uma associação definida entre a infecção por ZIKV e a microcefalia, nem todos os bebês nascidos de mães infectadas têm essas complicações, indicando que respostas imunes maternas robustas podem ser capazes de proteger o feto de efeitos prejudiciais da infecção por ZIKV em alguns casos (SINGH et al., 2017). Porém, O conhecimento sobre a resposta celular à infecção por ZIKV ainda é escasso (SAIZ, 2016). No entanto, já foi descrito que o ZIKV entra na célula usando fatores de adesão como o DC-SIGN e diferentes membros da família de receptores de fosfatidilserina. Dentro das células, as partículas virais liberam o genoma viral no citoplasma, para o início da tradução e replicação. A replicação do ZIKV provoca uma resposta imune antiviral, induzindo a transcrição de TLR3, RIG-I e MDA5, assim como de outros genes estimulados por interferon, como OAS2, ISG15 e MX1, caracterizados por uma expressão do gene de IFN β fortemente reforçada. E ainda, a infecção por ZIKV é sensível ao IFN, já que um pré-tratamento de fibroblastos primários com IFN α , β e γ reduz a infecção por ZIKV. Também foi demonstrado que ZIKV regula a via autofágica nos fibroblastos primários, o que é consistente com o que ocorre com outros flavivírus. Além disso, o aumento na expressão de IRF7, corrobora com a forte indução de IFN α e β nos fibroblastos infectados por ZIKV. E ainda, a expressão de quimiocinas inflamatórias, como CCL5, também são induzidas durante a infecção por ZIKV. E, a via do inflamassomo também parece ser ativada após a infecção por ZIKV (HAMEL et al., 2015, 2016; SAIZ, 2016).

Modelos murinos também foram utilizados para demonstrar os tipos de células imunes importantes na defesa contra ZIKV. Camundongos C57BL/6 imunocompetentes e camundongos CD1 não mostraram sinais de doença após infecção por ZIKV, enquanto que camundongos A129 e AG129, deficientes em IFN do tipo I e do tipo II, desenvolveram sinais de doença como postura encurvada e pelagem enrijada. E ainda, fetos de mães infectadas com

ZIKV demonstraram microcefalia (ROSSI et al., 2016; SINGH et al., 2017). Camundongos SJL também foram utilizados como modelos para infecção por ZIKV. Estes camundongos possuem resposta normal de IFN, porém, possuem respostas de células B prejudicadas e não possuem células NK. Os fetos destes camundongos não desenvolveram microcefalia, mas apresentaram formações corticais malignas, indicativas de microcefalia (CUGOLA et al., 2016). Estes dados apontam para a necessidade de imunidade mediada por células NK e resposta de anticorpos neutralizantes para combater a infecção por ZIKV (SINGH et al., 2017). Outro estudo recente demonstrou que linfócitos T não são tão importantes quanto a resposta de anticorpos neutralizantes na imunidade contra ZIKV (LAROCCA et al., 2016; SINGH et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Dengue e Zika são arboviroses que estão em alta expansão no mundo, com o risco de transmissão em qualquer localidade onde exista os mosquitos do gênero *Aedes*, o principal vetor das doenças. Porém, outros modos de transmissão estão sendo relacionados com ZIKV, como a transmissão vertical e sexual, e, além disso, já foi detectado vírus no leite materno, na urina e no sêmen, o que demonstra o potencial elevado de transmissão deste vírus.

A maioria dos pacientes com dengue e zika são assintomáticos ou apresentam uma doença de evolução benigna, a febre da dengue e a febre da zika, em ambas a maioria dos sintomas são resolvidos espontaneamente. Porém, já foi comprovado que a infecção tanto por DENV como por ZIKV pode causar complicações neurológicas graves. O DENV também pode causar a dengue grave, com extravazamento de plasma, hemorragia e comprometimento de órgãos como o fígado. Mas ainda não se tem o conhecimento de porquê a doença branda progride para uma doença mais grave.

Ainda existem várias lacunas de conhecimento sobre a patologia do DENV, principalmente nos casos em que os genótipos infectantes são neurotrópicos. Apesar de existirem vários modelos de estudo da patofisiologia de dengue, sendo alguns modelos em camundongos, nenhum modelo é suficientemente bom, sendo que é necessário se estudar a dengue em vários modelos murinos. A título de exemplo, o fato da proteína NS5 viral ser capaz de bloquear a STAT2 humana mas não a murina e da NS2B/3 viral ser capaz de bloquear a proteína STING humana mas não a murina, faz com que os seres humanos sejam mais susceptíveis ao vírus da dengue do que os camundongos, dificultando o estudo comparativo entre humanos e murinos (DIAMOND; PIERSON, 2015). Nosso grupo tem trabalhado com um DENV sorotipo 3 genótipo I, o qual foi isolado de um caso de dengue humano fatal em Belo Horizonte, sendo que o indivíduo teve sintomas relacionados com o sistema nervoso central. Nós caracterizamos, em duas teses de doutorado e publicamos sobre a neurovirulência fatal deste genótipo, em infecção intracerebral em camundongos C57BL/6 (AMARAL et al., 2011; DE MIRANDA et al., 2012; DE SOUZA et al., 2013; FERREIRA et al., 2010).

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947, isolado de um macaco *Rhesus*, na Floresta de Zika, em Uganda (DICK, 1952) e a primeira infecção humana foi relatada no Nigéria, em 1954 (MACNAMARA, 1954). Até recentemente era considerado que o ZIKV

causava infecções de evolução benignas e esporádicas em humanos na África e na Ásia (ENFISSI et al., 2016). Em 2007, ocorreu um surto nos Estados Federados de Micronésia (YAP), marcando a primeira detecção do vírus fora da África e Ásia (WHO, 2015). E em 2013-2014, o ZIKV causou uma grande epidemia na Polinésia Francesa, onde o ZIKV foi relacionado com o aumento incomum de complicações neurológicas graves, como a Síndrome de Guillain-Barre (OEHLER et al., 2014). Em 2015, o vírus foi detectado no Brasil, e foi relacionado aos casos de microcefalia e outras malformações congênitas. O ZIKV também já foi detectado em vários países da América Central, do Sul e Caribe (FARIA et al., 2016). Portanto, o vírus está em rápida expansão e vem sendo relacionado como a causa de doenças graves.

A dengue e a zika não possuem tratamento específico, antivirais ou vacinas. E ainda há uma carência de conhecimento sobre a patologia e a resposta imune desencadeada por estes vírus. Sabe-se que uma segunda infecção por DENV, por um sorotipo diferente da primeira infecção, pode levar a doença grave pela reação cruzada de anticorpos, mecanismo conhecido como ADE. Mas nem todas as doenças graves ocorrem somente na segunda infecção. Os mecanismos pelos quais o DENV causa a doença grave também precisam ser melhor elucidados. Também ainda não estão claros os mecanismos pelos quais o ZIKV causa as doenças neurológicas, como a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré.

A resposta imune é importante tanto no controle como na patologia da doença grave. Nosso trabalho teve como objetivo estudar a resposta imune inata celular desencadeada por dois genótipos de DENV 3, um neurotrópico e outro não neurotrópico, fazendo uma comparação *in vitro*. E ainda, estudar a resposta imune inata celular desencadeada por dois isolados de ZIKV. Assim procuramos contribuir para um melhor entendimento sobre a resposta imune inata desencadeada por DENV e por ZIKV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

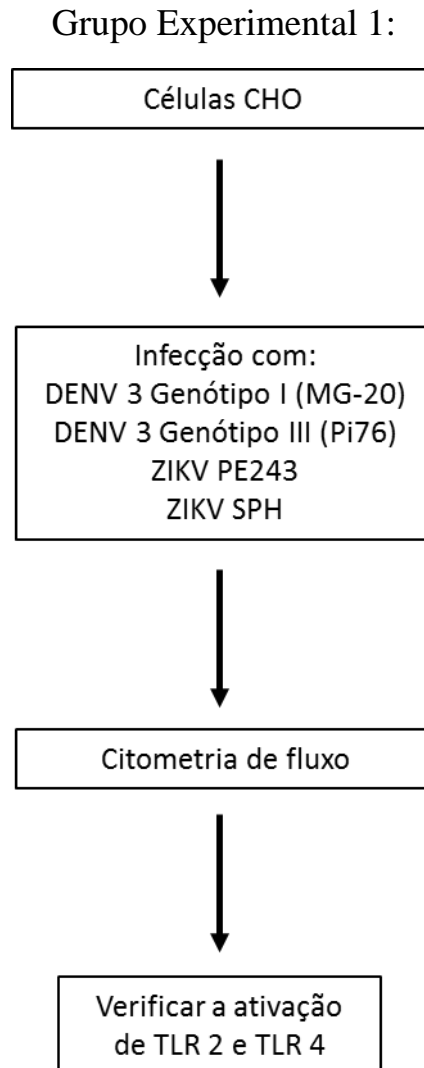
Comparar a resposta imune inata celular desencadeada por dois isolados de *Dengue virus*, um neurovirulento e outro não neurovirulento. E comparar a resposta imune inata celular desencadeada por dois isolados brasileiros de *Zika virus*.

3.2 Objetivos específicos

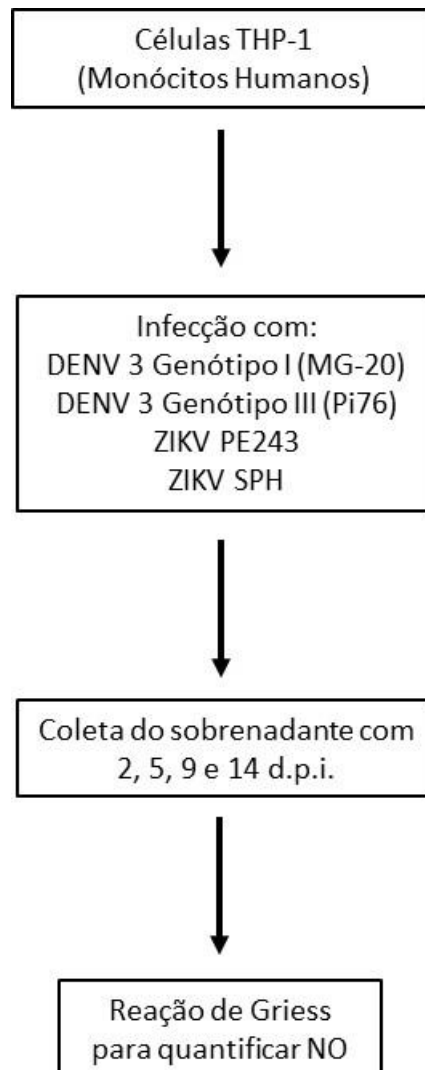
- ✓ Confirmar que os isolados brasileiros de ZIKV são realmente ZIKV e que não há contaminação por DENV;
- ✓ Verificar se DENV e ZIKV ativam TLR2 e/ou TLR4 em células CHO transfectadas estavelmente com estes TLRs.
- ✓ Avaliar a produção de óxido nítrico, em diferentes dias após a infecção, nas células KG-1, THP-1 e em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 infectados com os diferentes isolados de DENV e de ZIKV;
- ✓ Avaliar a produção das citocinas IFN γ , TNF, IL-6, IL-10, em diferentes dias após a infecção, nas células KG-1 infectadas com os diferentes isolados de DENV e de ZIKV;
- ✓ Avaliar a produção das citocinas IFN γ , TNF, IL-6, IL-10 e da quimiocina MCP-1, em diferentes dias após a infecção, nos macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 infectados com os diferentes isolados de DENV e de ZIKV;
- ✓ Avaliar a permissividade das células KG-1 e dos macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 após a infecção com os diferentes isolados de DENV e de ZIKV;

4 METODOLOGIA

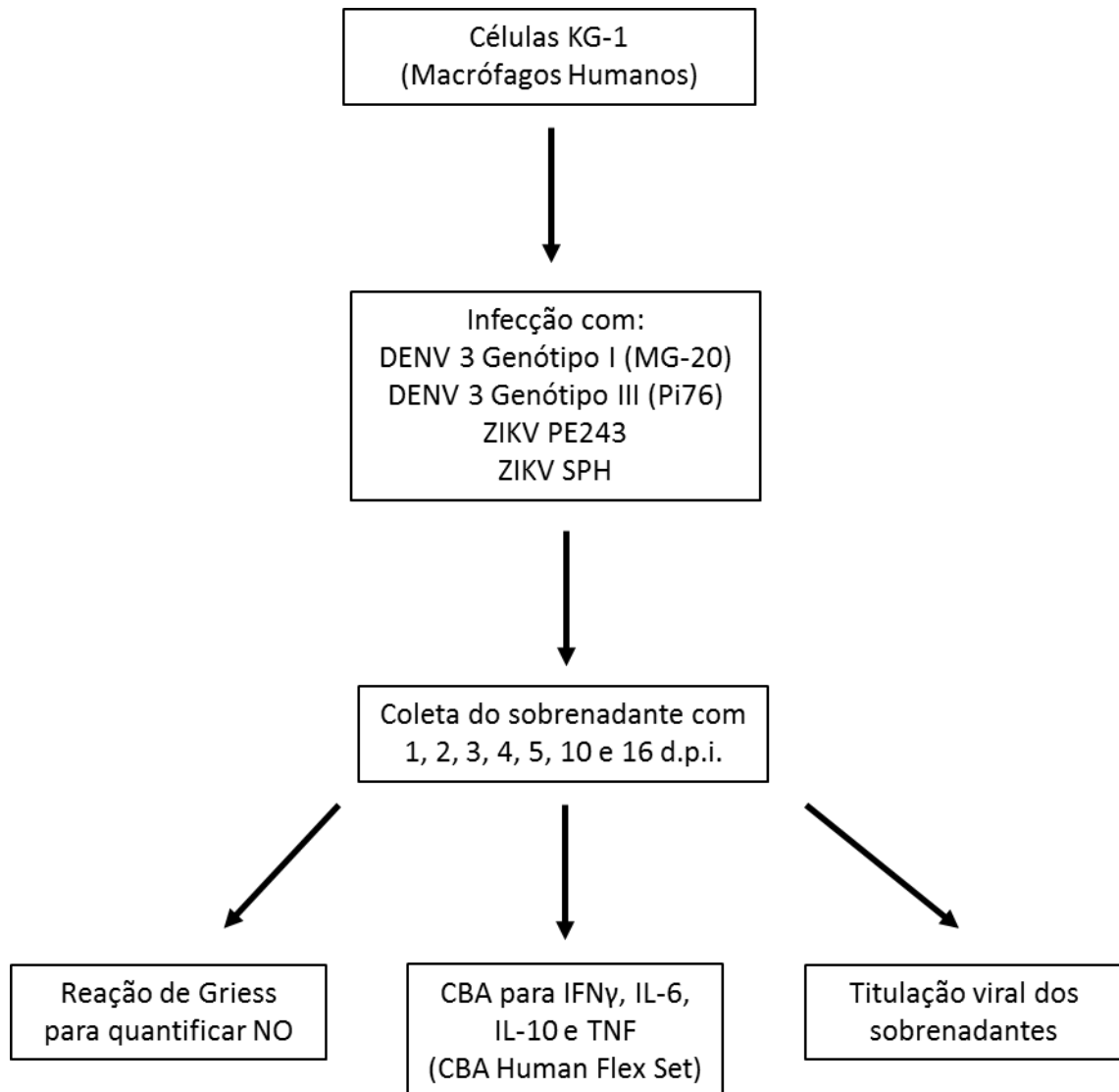
4.1 Estratégias de trabalho



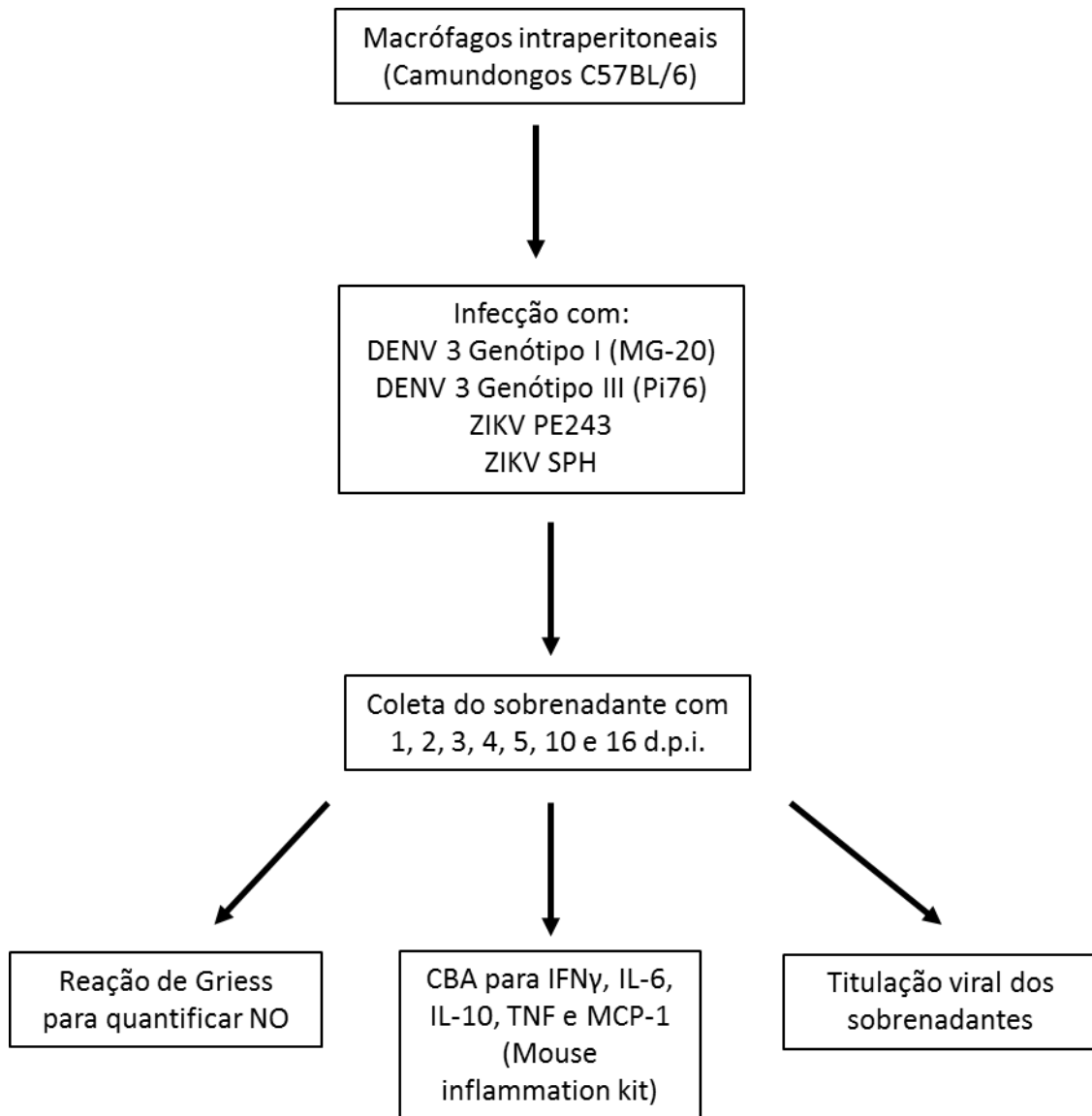
Grupo Experimental 2:



Grupo Experimental 3:



Grupo Experimental 4:



4.2 Animais

Para a obtenção de macrófagos peritoneais murinos, foram utilizados camundongos C57BL/6. Todos os protocolos de experimentação com camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da FIOCRUZ-RJ. A licença para o projeto “Resposta imune a dengue vírus em modelo murino” tem duração até 29/02/2020 sob o número LW-7/16. E a licença para o projeto “Estudo da resposta imune inata contra Zika virus em modelo murino” tem duração até 28/11/2020 sob o número LW-33/16. As cópias dos certificados de aprovação encontram-se anexadas na dissertação (**Anexos 9.1 e 9.2, respectivamente**).

4.2.1 Anestesia

Antes da eutanásia, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) (dose obtida no Manual de Normas Técnicas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 2004), via intraperitoneal, no quadrante lateral inferior direito, com volume máximo 40µL, com agulha 8,0 x 0,3 mm, e seringa BD Ultra-fine II de 50 UI ou 0,5 mL. Após aplicação do medicamento, o plano anestésico foi monitorado pela avaliação dos reflexos motores e palpebrais dos camundongos.

4.3 Cultivo celular

4.3.1 Células C6/36

As células C6/36 são células de linhagem contínua de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC). Estas células foram cultivadas em meio Leibowitz (L-15) (Cultilab), com adição dos antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) e do antifúngico anfotericina B (5µg/mL) e 7% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), em estufa incubadora B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) a 28°

C. Estas células foram utilizadas para a multiplicação viral e produção dos estoques virais de DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III e ZIKV PE243.

4.3.2 Células Vero

Células Vero são células de linhagem contínua, derivadas de rim de macaco verde africano e foram adquiridas do ATCC. Estas foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) [Gibco], com adição do antibiótico ciprofloxacino (10 µg/mL) e 5% de SFB (Cultilab), mantidas em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para a multiplicação viral e obtenção do estoque de ZIKV SPH, e titulação dos estoques de ZIKV SPH e ZIKV PE243.

4.3.3 Células BHK-21

Células BHK-21 são células de linhagem contínua, derivadas de rim de hamster e foram adquiridas do ATCC. Estas foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Gibco), com adição dos antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) e do antifúngico anfotericina B (5µg/mL) e 5% de SFB (Cultilab), mantidas em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para a titulação dos estoques de DENV genótipo I e genótipo III.

4.3.4 Células CHO

Todas as linhagens das células CHO utilizadas (derivadas de ovário de hamster chinês) são derivadas do clone 3E10, uma linhagem de células CHO/CD14 que foi estavelmente transfectada com uma construção repórter contendo o gene estrutural CD25 sob o controle do promotor E-selectina humano. Esse promotor contém um sítio de ligação de NFκB e, portanto, a expressão de CD25 é completamente dependente da translocação do NFκB para o núcleo. As células CHO expressam TLR4 endógeno, que reage com anticorpo anti TLR4 humano. Estas foram utilizadas para o estudo da ativação de TLR4 após infecção com os vírus DENV e ZIKV. Também foi utilizada uma linhagem não responsiva ao LPS, derivada do clone 3E1022,

denominado 7.19, que é o controle negativo de células, que não respondem ao TLR2 e nem ao TLR4, quando inoculadas por algum agonista de TLR2 ou de TLR4. As células do clone 7.19 foram adicionalmente transfectadas estavelmente com TLR2 humano e foram utilizadas para o estudo da ativação de TLR2 após a infecção com os vírus DENV e ZIKV. O fenótipo das linhagens 7.19 não responsivo ao LPS é devido a uma mutação no gene MD-2, o que o torna defeituoso na via de sinalização TLR4 (DELUDE et al., 1998).

Estas células foram uma generosa doação do Dr. Douglas T. Golenbock (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA). Estas células foram cultivadas em meio F12/DMEM (1:2), suplementado com 5% de SFB (Gibco), com adição de antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL) e Hygromicina B (0,25mg/mL), para as células 7.19 e TLR4 e, para as células TLR2, foram adicionados os antibióticos ciprofloxacino (10µg/mL), Hygromicina B (0,25mg/mL) e Geneticina (0,5mg/mL). As células foram cultivadas em estufa, em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

4.3.5 Células THP-1

As células THP -1 são células em suspensão, são monócitos humanos (células de linhagem contínua) do sangue periférico de um paciente humano com leucemia monocítica. Estas foram adquiridas do ATCC. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 5% de SFB (Gibco), com adição do antibiótico ciprofloxacino (10 µg/mL), em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para a análise das citocinas produzidas por CBA.

4.3.6 Células KG-1

As células KG-1 são células de linhagem contínua e são macrófagos humanos da medula óssea de um paciente com leucemia mieloide aguda. Estas foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 5% de FBS (Gibco), com adição do antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL), em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para a análise das citocinas produzidas por CBA.

4.3.7 Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL/6 (n = 5 por experimento) adquiridos no Biotério de Produção do Centro de Pesquisas René Rachou foram inoculados intraperitonealmente com 2mL de Tioglicotato a 3%. Após 4 dias, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem do peritônio para a coleta dos macrófagos, com 5mL de DMEM gelado sem soro e com antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL). Foi feito um “pool” dos meios coletados, os quais foram centrifugados a 1200 r.p.m. (Centrífuga Beckman GS-6R, rotor GH 3.8) durante 7 min.. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5mL de DMEM com 5% SFB (Cultilab) e antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL). Foi feita a contagem do número de células viáveis com azul de tripan em câmara de Neubauer e 2×10^5 macrófagos foram semeados por poço de placa de 96 poços. As células foram incubadas durante 3h em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para que os macrófagos aderissem à placa. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 200µL de DMEM com 5% SFB (Cultilab) e antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL). Os macrófagos foram cultivados de um dia para o outro em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. No dia seguinte, as células foram infectadas com os vírus.

4.4 DENV 3

As amostras de DENV 3 utilizadas foram doadas pelo Laboratório de Virologia da UFMG. Foram utilizados os vírus DENV sorotipo 3 (DENV 3) genótipo III (Pi76), não neurotrópico, e DENV 3 genótipo I (MG-20), neurotrópico. DENV 3 genótipo III foi isolado a partir do soro de um paciente que apresentava manifestações clínicas de dengue sem sintomas relacionados ao Sistema Nervoso Central (SNC), o soro foi coletado em Centro de Saúde de Teresina e no interior do estado do Piauí e cedido pelo Centro de Ciências da Saúde da UFPI em 2006. DENV 3 genótipo I, foi isolado a partir do soro de um caso fatal de dengue com acometimento do SNC, de um paciente da região metropolitana de Belo Horizonte e cedida pela Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, no ano de 2005. Em um trabalho já publicado por nosso grupo de pesquisa, foi confirmado que a amostra de DENV 3 genótipo I causa uma doença neurológica fatal em camundongos C57BL/6 selvagens e que a mortalidade é dose dependente (DE SOUZA

et al., 2013). Os dois genótipos de DENV 3 foram utilizados para comparar a resposta imune *in vitro* contra um sorotipo de genótipo neurotrópico e a resposta imune *in vitro* contra um sorotipo de genótipo não-neurotrópico.

4.4.1 Multiplicação de DENV 3

As amostras de DENV foram inoculadas com m.o.i. de 0,1 em células C6/36, sendo visualizadas diariamente, ao microscópio óptico, até as células apresentarem efeito citopático (ECP) quando comparadas às células controle. Quando a formação de sincícios foi superior a 50% o sobrenadante foi centrifugado a 3.000 r.p.m., por 5 min., em centrífuga Sorvall RT-6000B, rotor H1000B, a 4°C. O sobrenadante clarificado foi coletado e distribuído em alíquotas de 0,2 mL e estocadas a -70°C para uso posterior.

4.4.2 Titulação de DENV 3

Para determinar o título viral utilizamos a técnica de formação de placas de lise. Para tal, foram implantadas $2,5 \times 10^5$ células BHK em placas de 6 poços com meio DMEM (Gibco) suplementado com 5% de SFB (Cultilab), antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) e antifúngico anfotericina B (5µg/mL). Estas placas foram incubadas “overnight” a 37° C em estufa com atmosfera de 5% CO₂. Em seguida, 400 µL do vírus diluído seriadamente foram inoculados em células com monocamada com cerca de 80% de confluência. Os vírus foram diluídos de 10⁻¹ a 10⁻⁷, e, nas células, foram acrescentadas as diluições 10⁻³ a 10⁻⁷. Como controle foi utilizado um poço com células não infectadas. Após adsorção de 1 h, foi adicionado meio DMEM contendo 1% de carboximetil celulose (CMC) e 2% de SFB, as placas foram incubadas a 37°C por 5 dias em estufa com 5% de CO₂. As células foram fixadas em solução de formaldeído a 3,7% e coradas com solução de cristal violeta a 1%. O título viral foi determinado pela contagem do número de placas de lise x inverso da diluição x correção para 1mL.

4.5 ZIKV

Foram utilizadas duas amostras de ZIKV isoladas em 2015 do soro de pacientes sintomáticos: ZIKV PE243, isolado de um paciente de Recife, Pernambuco (DUTRA et al., 2016), cedidas por Marli Tenório Cordeiro (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães /FIOCRUZ); e ZIKV SPH, isolado de um paciente do sexo masculino, de 52 anos, de Sumaré, São Paulo (FARIA et al., 2016), cedidas por Pedro F. C. Vasconcelos (Instituto Evandro Chagas). Foram utilizadas as duas amostras para fazer uma comparação entre as respostas imunes ativadas por cada ZIKV. Estes vírus foram multiplicados pela aluna de doutorado Ketyllen Reis, do Grupo de Pesquisa Imunologia de Doenças Virais – CPqRR.

4.5.1 Confirmação das espécies virais

4.5.1.1 Extração de RNA viral

A extração do RNA viral foi feita utilizando o kit de extração QIAampR Viral RNA (QIAGEN) seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, 140 μ L dos sobrenadantes virais foram adicionados a 560 μ L do tampão AVL, incubados à temperatura ambiente por 10 min. e, então, foram adicionados 560 μ L de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e o volume total da amostra foi aplicado na coluna de sílica (em duas vezes de 630 μ L), que foi centrifugada. Foram feitas duas lavagens da coluna com os tampões AW1 e AW2 para retirada de outros componentes celulares e possíveis resíduos. O RNA viral foi eluído com 60 μ L de tampão AVE e armazenado a -70°C . O RNA extraído serviu de molde para a síntese de DNA complementar (cDNA).

4.5.1.2 *Produção de DNA complementar (cDNA)*

Para a produção de DNA complementar (cDNA), 5 µL de RNA total foi incubado a 70°C, por 5 min., juntamente com 2 µL do oligonucleotídeo iniciador senso (2F-5 mM). Após incubação em gelo, foram adicionados à reação: 5 µL de tampão de RT 5X (250 mM Tris pH 8.9, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl, 50mM DTT), 1,5 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de RNAsin (ribonuclease inhibitor - Promega) (20U) e 1 µL de enzima M-MLV RT (200U/µL) (Promega) e água, para um volume total de 25 µL. A reação foi incubada por 60 min. a 37°C. Os cDNAs obtidos foram, então, utilizados na PCR semi-nested, utilizada para confirmar os genótipos de DENV e excluir a possibilidade de que o ZIKV estivesse misturado com algum DENV, e o PCR em Tempo Real, para confirmação dos dois isolados de ZIKV.

4.5.1.3 *Confirmação de ZIKV por PCR em tempo real*

Para a PCR em tempo real de ZIKV, foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti *et al* (2008), utilizando-se os primers ZIKV 1086 e ZIKV 1162c e a sonda ZIKV 1107-FAM, listados na tabela 1. Foi utilizado 1 µL dos cDNA's obtidos no item 4.5.1.2, 5 µL de TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems), 0,1 µL de cada iniciador (10µM), 0,25 µL da sonda (10 µM) e H₂O ultrapura q.s.p. 10 µL. As amostras foram amplificadas no StepOne Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), seguindo as condições de amplificação do aparelho.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real para a confirmação das amostras de ZIKV (Lanciotti *et al*, 2008).

Iniciador	Sequencia	Posição no genoma
ZIKV 1086	5' - CCGCTGCCCAACACAAG - 3'	1086–1102
ZIKV 1162c	5' - CCACTAACGTTCTTTGCAGACAT - 3'	1162–1139
ZIKV 1107-FAM	5' - AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA - 3'	1107–1137

4.5.1.4 Confirmação da autenticidade das amostras de ZIKV utilizadas por DENV PCR semi-nested para

Para a PCR semi-nested de DENV, foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (1992), visando à amplificação da região C-prM do genoma de DENV. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 2.

Para a primeira reação, foram utilizados 2,5 µL do cDNA obtido no item 4.5.1.2, 2,5 µL de tampão 10x, 10 pmol de cada nucleotídeo iniciador D1 e D2 (tabela 2), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTP's, 0,25 µL de Taq polimerase (Promega) (5 U/µL) e H₂O ultrapura quantidade suficiente para (q.s.p.) 25 µL. As amplificações foram feitas em termociclador (Eppendorf), seguindo as seguintes variações de tempo e temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por 45 segundos, pareamento a 58°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min..

Na segunda reação foram utilizados os iniciadores D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 (tabela 2) (PCR Multiplex), para amplificação dos fragmentos específicos de cada sorotipo de DENV. Foram utilizados 2,5 µL dos produtos da primeira reação diluídos 1:50, 2,5 µL de tampão 10x, 10 pmol de cada nucleotídeo iniciador D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 (tabela 2), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTP's, 0,25 µL de Taq polimerase (Promega) (5 U/µL) e H₂O ultrapura q.s.p. 25 µL. As amplificações foram feitas em termociclador (Eppendorf), seguindo as seguintes variações de tempo e temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por 45 s., pareamento a 60°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1min.

Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificar os sorotipos de DENV no PCR semi-nested.

Iniciador	Sequencia	Posição no genoma	Tamanho do fragmento amplificado
D1	5' - TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG - 3'	134-161	511
D2	5' - TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC - 3'	616-644	511
TS1	5' - CGTCTCAGTGATCCGGGGG - 3'	568-586	482 (D1 e TS1)
TS2	5' - CGCCACAAGGGCCATGAACAG - 3'	232-252	119 (D1 e TS2)
TS3	5' - TAACATCATCATGAGACAGAGC - 3'	400-421	290 (D1 e TS3)
TS4	5' - CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392 (D1 e TS4)

Para a análise dos fragmentos de DNA amplificados, foram utilizados 10 μ L da segunda reação que foi analisado em gel de poliacrilamida 8% (acrilamida e bis-acrilamida ultra pura 30%, Invitrogen) em TBE 1X (0,089M TRIS-ACETATO, 0,089M ácido bórico, 0,002M EDTA). As amostras foram submetidas ao fracionamento eletroforético a 100V utilizando-se tampão TBE 1X. O gel foi fixado em solução fixadora A (40% metanol, 10% ácido acético, v/v) e solução fixadora B (10% etanol, 5% ácido acético v/v). Após incubação com solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M, ácido nítrico 0,032 M) por 5 min., o gel foi corado com nitrato de prata (0,6 g/300 mL de água) por 20 min.. Em seguida, o gel foi lavado com água deionizada por 1 min., acrescentando-se a solução reveladora (5,9 g de carbonato de sódio, 0,1 g de paraformaldeído) e incubando-se por 5 min.. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido acético a 5%.

4.6 Verificação da ativação de TLR 2 e TLR 4 em células CHO por citometria de fluxo

Para avaliar a ativação de TLR2 e TLR4, com consequente translocação nuclear de NF κ B, disparada pelos vírus DENV3 genótipo I, DENV3 genótipo III, ZIKV PE243, ZIKV SPH, as células CHO 7.19, TLR 2+ e TLR 4+ foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ por poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, a monocamada foi infectada pelos vírus com m.o.i. de 1 e 10 e foi incubada a 37°C e 5% CO₂ durante 18 h. Como controle de ativação de TLR 2, foi adicionado *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (10³ bactéria/poço). E, como controle de ativação de TLR4, foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) (100 ng/poço), sendo que ambos também ficaram em contato com as células durante 18 h em atmosfera de 5% CO₂ e 37°C. Após este tempo, as células foram coletadas com tripsina-EDTA, transferidas para o tubo de citômetro e lavadas com meio e PBS 1x. Em seguida, as células foram coradas com anticorpo PE anti CD25 (mouse mAb to human CD25, R-PE conjugate; Invitrogen) diluídos 1:200 em PBS 1x, no gelo e no escuro, durante 2h. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x com 1mM de azida de sódio, ressuspendidas neste PBS e examinadas em citometria de fluxo no FACScan (BD Biosciences), do Centro de Pesquisas René Rachou, com o auxílio do técnico responsável. As análises foram feitas utilizando o software FlowJo.

4.7 Infecção e coleta dos sobrenadantes das células THP-1 e KG-1

As células THP-1 e KG-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 como já descrito. Como são células em suspensão, estas foram centrifugadas a 1200 r.p.m. em centrífuga Beckman GS-6R (rotor GH 3.8) a 25°C e foram ressuspensas em 4mL de meio RPMI-1640 suplementado com 5% de SFB (Gibco) e antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL). Foi feita a contagem do número de células viáveis com azul de tripan e 2×10^5 células foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços, no volume de 100µL de meio RPMI-1640. As placas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. No dia seguinte, os vírus (DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III) com m.o.i. de 1 e 10 e os vírus ZIKV PE243 e ZIKV PBH com m.o.i. de 1 foram acrescentados às células, sendo um vírus por poço, no volume de 300µL de meio RPMI-1640 suplementado com 5% SFB, com antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL) e concentração sub-ótima de IFN γ (10U/mL) para primar as células. Foi utilizado um grupo de células controle, sem o estímulo do vírus e de IFN γ e outro grupo controle com o estímulo de IFN γ mas sem o estímulo viral. Como controle positivo foi utilizado *E.coli*.

Os sobrenadantes das células THP-1 foram coletados com 2, 5, 9 e 14 dias após a infecção. Já os sobrenadantes das células KG-1 foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção. Os sobrenadantes foram centrifugados a 800 x g durante 5min. a 4°C (centrífuga Eppendorf) para a formação do “pellet” contendo “debrí” celular e células, já que as células são em suspensão, e assim, somente os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo de 1,5mL e armazenados no freezer -70°C para posterior análise.

4.8 Infecção e coleta dos sobrenadantes dos macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6

Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 foram coletados e 2×10^5 macrófagos foram plaqueados por poço de placa de 96 poços como já descrito. Após um dia de incubação em estufa com atmosfera de 5% CO₂ e 37°C os sobrenadantes foram descartados e os vírus DENV 3 genótipo I, e DENV 3 genótipo III, com m.o.i. 1 e 10, e ZIKV PE243 e ZIKV PBH com m.o.i. de 1, foram acrescentados às células, sendo um vírus por poço, no volume de 300µL de meio DMEM 5% SFB com antibiótico ciprofloxacino (10µg/mL) e IFN γ (10U/mL).

Foi utilizado um grupo de células controle, sem o estímulo do vírus e de IFN γ e outro grupo controle com o estímulo de IFN γ mas sem o estímulo viral. Como controle positivo foi utilizado *E.coli*.

Os sobrenadantes foram coletados após 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção. Os sobrenadantes foram centrifugados a $800 \times g$ durante 5min. a 4°C (centrífuga Eppendorf), para a formação do “pellet” contendo o “debris” celular, e assim, somente os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo de 1,5mL e armazenados no -70°C para posterior análise.

4.9 Verificação da produção de NO induzida por DENV e ZIKV em células KG-1, THP-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6

Para a quantificação do óxido nítrico produzido pelas células THP-1, KG-1 e pelos macrófagos intraperitoneais após a infecção pelos vírus, foi utilizada a Reação de Griess, segundo o protocolo de Drapier (1988).

Para fazer dosagem de óxido nítrico, 50 μ L dos sobrenadantes coletados nos itens 4.7 e 4.8 foram adicionados em placas de 96 poços. Foi montada uma curva padrão utilizando nitrito de sódio (NaNO₂) em diluição seriada em meio DMEM, como referência para avaliar a concentração de óxido nítrico (NO) nas amostras, após reação com solução C. Esta solução consiste da mistura das soluções de A e B (1:2), sendo solução A composta por sulfenilamida 1% em 2,5% de ácido fosfórico (H₃PO₄), e solução B por N-(1-naphthyl) etilenodiamina (NED) 0,1% em 2,5% de ácido fosfórico (H₃PO₄). Para a reação, também foi acrescentado 50 μ L de solução C a cada poço com amostra.

A leitura foi feita em espectrofotômetro (*Molecular Devices. Versamax tunable microplate reader*) em um comprimento de onda de 550nm. Os valores foram calculados pelo programa GraphPad Prism e expressos em μ M.

4.10 Quantificação das citocinas produzidas pelas células KG-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6

Para o ensaio de CBA, os sobrenadantes das células KG-1 coletados no item 4.7 foram utilizados para a dosagem das citocinas IFN γ , IL - 6, IL - 10, TNF, segundo descrito pelo fabricante do CBA Human Flex Set (BD Biosciences).

Os sobrenadantes dos macrófagos coletados no item 4.8 foram utilizados para a dosagem das citocinas IFN γ , IL-6, IL-10, TNF e MCP 1, segundo descrito pelo fabricante do CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences).

Antes de iniciar o processo de avaliação das citocinas, as esferas do padrão foram reconstituídas e incubadas à temperatura ambiente por 15 min., como descrito no manual do fabricante. Em seguida, as esferas foram diluídas seriadamente (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256) com “Assay diluent” disponível no kit, obtendo assim uma curva padrão. Foram transferidos 50 μ L de dada diluição para um poço de uma placa de 96 poços com fundo cônico, um poço foi destinado ao controle negativo, no qual foi colocado somente 50 μ L “Assay diluent”. As “beads” de captura também foram preparadas segundo o protocolo do kit. Cada “bead” foi vortexada imediatamente antes de ser adicionada à mistura. Foi feita uma mistura de “beads” de captura, adicionando 10 μ L de cada “bead” por amostra, de acordo com o número de amostras a serem analisadas. Foram adicionados 50 μ L desta mistura na placa de 96 poços, sendo um poço por amostra e por padrão diluído. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de amostra por poço da placa de 96 poços e 50 μ L do reagente de detecção PE. A placa foi incubada por 2h., em temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de “Wash buffer” por poço e a placa foi centrifugada a 200g por 5 min.. Os sobrenadantes foram aspirados e descartados e foi adicionado 300 μ L de “Wash buffer” por poço, para a ressuspensão do “pellet”.

A leitura dos dois kits foi feita no aparelho FACSCan (BD Biosciences) do Centro de Pesquisa do René Rachou, com o auxílio de técnico responsável. A análise do kit CBA Human Flex Set foi feita no software FACSArray 1.0 (BD Biosciences), enquanto que a análise do kit CBA Mouse Inflammation foi feita no software CellQuest (BD Biosciences). Os dois softwares de análises calcularam a intensidade média de fluorescências (MFI) de cada amostra e de cada curva. Os valores da MFI das amostras e das curvas, sendo uma curva por citocina, foram

plotados no programa GraphPad Prism, e interpolados com os valores de cada curva e a produção de cada citocina foi calculada em pg/mL.

4.11 Titulação viral dos sobrenadantes das células KG-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6

Para determinar a quantidade de DENV e ZIKV vivos ao longo dos dias pós infecção, foram determinadas as unidades formadoras de placas (p.f.u.) dos sobrenadantes das células KG-1 e dos macrófagos intraperitoneais infectados por DENV e ZIKV, utilizando células BHK-21. Para tal, foram implantadas $2,5 \times 10^5$ células em placas de 6 poços com meio DMEM (Gibco) suplementado com 5% de SFB (Cultilab) e antibiótico ciprofloxacino ($10\mu\text{g/mL}$). Estas placas foram incubadas “overnight” a 37°C em estufa com atmosfera de 5% CO_2 . Em seguida, $400\ \mu\text{L}$ dos sobrenadantes diluídos seriadamente foram inoculados em células com monocamada com cerca de 80% de confluência. Nos sobrenadantes de células KG-1, a titulação foi feita nos dias 1, 3, 5 e 10 após a infecção, nas células infectadas com m.o.i. 1, e 2 e 10 dias nas células infectadas com m.o.i. 10. E nos macrófagos intraperitoneais, a titulação foi feita nos dias 1, 3, 5, 7 e 10, nas células infectadas com m.o.i. 1, e 2 e 10 dias nas células infectadas com m.o.i. 10. Os sobrenadantes de células KG-1, foram acrescentadas nas diluições 10^{-3} a 10^{-7} nas células BHK-21. Os sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais, no 1° e 2° d.p.i., foram acrescentadas as diluições 10^{-3} a 10^{-7} . No 3° e 5° d.p.i., foram acrescentadas as diluições 10^{-2} a 10^{-6} . E, no 7° e 10° d.p.i., foram acrescentadas as diluições 10^{-1} a 10^{-5} . Como controle foi utilizado um poço com células não infectadas. Após adsorção de 1h., foi adicionado meio DMEM contendo 1% de carboximetil celulose (CMC) e 2% de SFB, as placas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 , por 10 dias, para os sobrenadantes das células KG-1 infectadas com m.o.i. 1, e, por 7 dias, para os sobrenadantes das células KG-1 infectadas com m.o.i. 10 e para os sobrenadantes dos macrófagos intraperitoneais. As células foram fixadas em solução de formaldeído a 3,7% e coradas com solução de cristal violeta a 1%. O título viral foi determinado pela contagem do número de placas de lise, e o resultado foi apresentado em ordem de grandeza.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação da autenticidade das amostras de ZIKV

Já para os ZIKV, foi feita a PCR em tempo real para verificar se as amostras de ZIKV utilizadas são realmente ZIKV, utilizando iniciadores e sonda específicos para ZIKV, descritos na tabela 1.

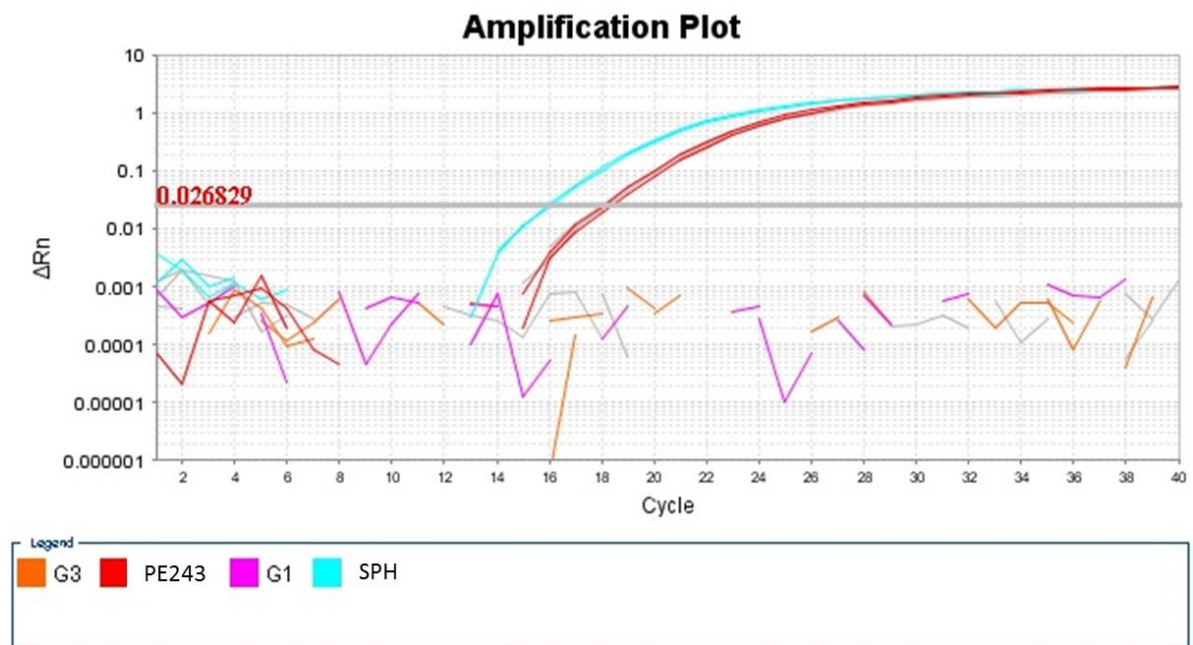


Figura 10: Comprovação das amostras de ZIKV por PCR em Tempo Real. Foi feita a extração de RNA e a transcrição reversa das amostras amplificadas de cada vírus. O cDNA obtido foi utilizado em uma PCR em Tempo Real segundo Lanciotti *et al* (2008). G3: DENV 3 genótipo III (laranja); PE243: ZIKV PE243 (vermelho); G1: DENV 3 genótipo I (rosa); SPH: ZIKV SPH (azul); Controle negativo (cinza).

Na Figura 10 é possível observar que somente as amostras de ZIKV foram amplificadas, sendo a amostra PE243 (ZIKV PE243), em vermelho, no ciclo 18, e a amostra SPH (ZIKV SPH), em azul, no ciclo 16, comprovando que estas amostras são de ZIKV. Não houve amplificação para DENV 3 genótipo III (G3), em laranja, assim como para DENV 3 genótipo I (G1), em rosa.

Outra técnica utilizada para a comprovação da ausência de contaminação das amostras de ZIKV PE243 e SPH por algum sorotipo de DENV foi a PCR semi-nested, seguindo o protocolo descrito por Lanciotti (1992), utilizando iniciadores específicos para DENV (tabela 2). O produto da PCR foi analisado em um gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato prata. Como controles positivos, foram utilizadas as amostras de DENV 3 genótipo I e genótipo III.

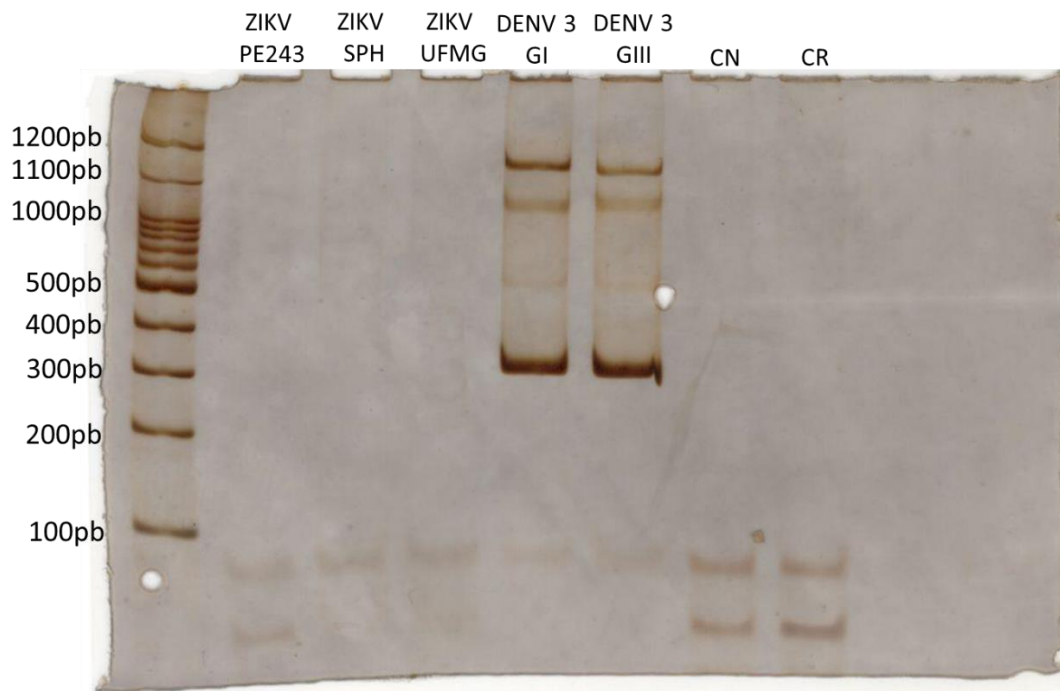


Figura 11: Comprovação da ausência de contaminação com DENV 1, 2, 3 e 4 das amostras de ZIKV, por PCR semi-nested. Foi feita a extração de RNA e a transcrição reversa do pool trabalho dos vírus ZIKV PE243 e SPH. O cDNA obtido foi utilizado em uma PCR semi-nested segundo Lanciotti *et al* (1992), os amplificadores obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e corado com nitrato de prata. ZIKV PE243 e SPH: duas amostras de ZIKV utilizadas neste trabalho; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III; CN: Controle negativo; CR: Controle de reação.

É possível observar uma banda correspondente a 290 pb, próxima à banda de 300 pb do padrão, nas canaletas referentes às amostras de DENV (figura 11), que é o tamanho esperado para o sorotipo 3, utilizando o iniciador específico para DENV 3 descrito por Lanciotti (1992) (tabela 2). E ainda, na figura 11 também é possível observar que não há nenhuma banda nas canaletas referentes às amostras de ZIKV.

5.2 Ativação de TLR2 e/ou 4 por DENV e ZIKV em células CHO transfectadas estavelmente com estes TLRs

Para avaliar se os genótipos I e III de DENV 3 e se os ZIKVs estudados provocam a ativação *in vitro* de TLR2 e/ou TLR4, células CHO transfectadas estavelmente com estes TLRs (TLR2+ e TLR4+) e células CHO que não possuem TLRs funcionais (TLR2-TLR4-) foram expostas aos vírus DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 ou ZIKV SPH (m.o.i. 1 ou 10). Após 18h as células foram coletadas e coradas com anticorpo PE antiCD25 (mouse mAb to human CD25, R-PE conjugate; Invitrogen). Como descrito em material e métodos, o CD25 é um gene repórter que indica a translocação nuclear de NFkB, dependente da ativação de TLR. Foram utilizados *S. aureus*, como controle positivo para a ativação de TLR2, e LPS, como controle positivo para a ativação de TLR4. Também foram utilizados sobrenadantes de células C6/36 (Figuras 12 e 13), nas quais os vírus DENV e o ZIKV PE243 foram multiplicados, e sobrenadantes de células Vero (Figura 13), nas quais o ZIKV SPH foi multiplicado. Os sobrenadantes foram utilizados para mostrar que eles não ativam estes TLRs, ou seja, que a ativação é causada pelos vírus. A leitura foi feita no citômetro FACScan (BD Biosciences). Para a análise, foram feitos histogramas no software FlowJo, utilizando o histograma das células não estimuladas (Figuras 12 e 13 – Histograma vermelho) para comparação com os histogramas das células estimuladas (Figuras 12 e 13 – Histograma azul).

5.2.1 Ativação de TLR 2 e/ou TLR 4 em células CHO que expressam TLR 2 e TLR 4 expostas aos DENV genótipo I e genótipo III

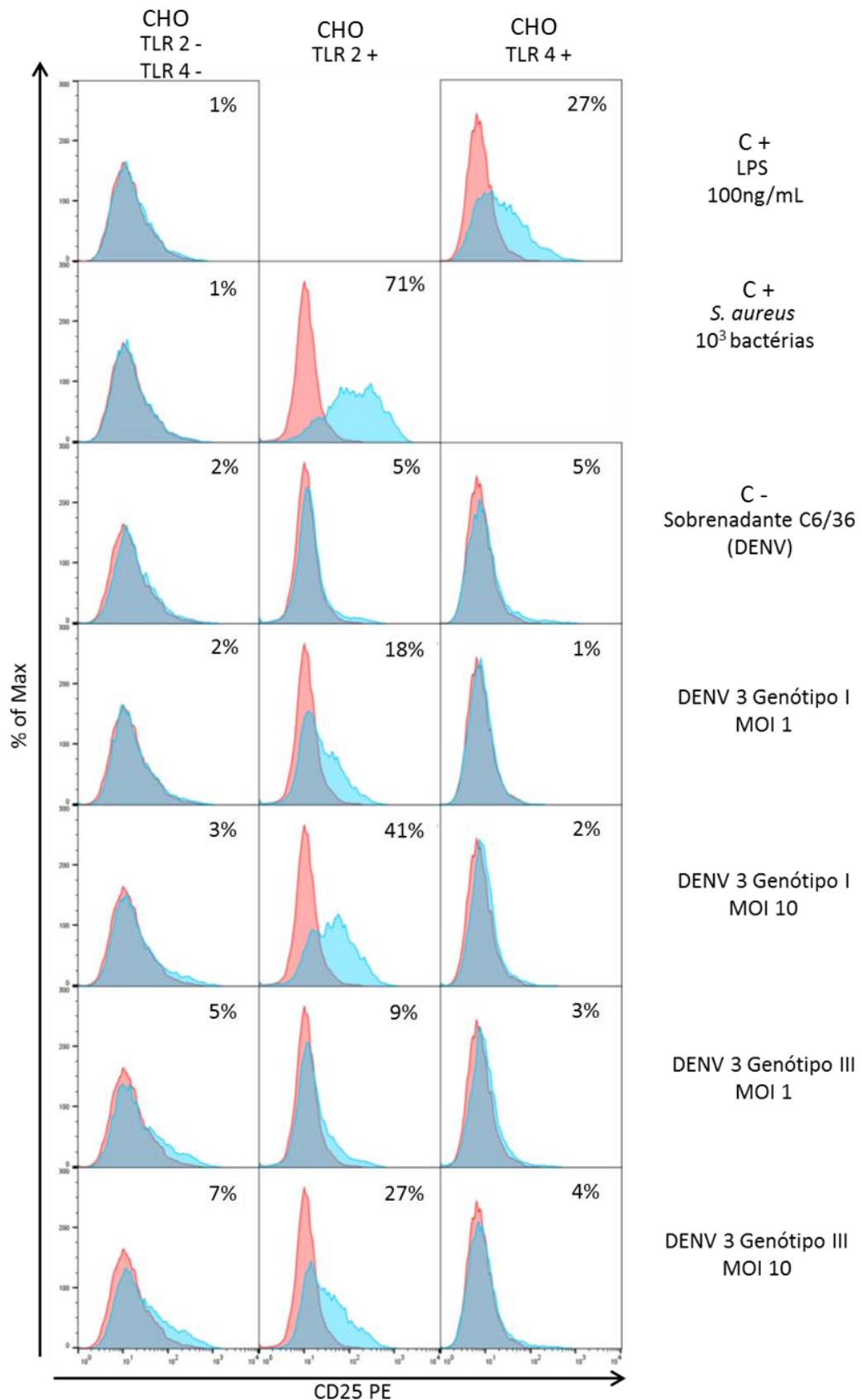


Figura 12: Ativação de TLR2 por DENV 3 genótipo I e genótipo III. Células CHO transfectadas estavelmente com TLR2 (TLR2+), TLR4 (TLR4+) ou com nenhum deles (TLR2- / TLR4-) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células por poço em placa de 24 poços. As células foram estimuladas com DENV 3 genótipo I e DENV 3 genótipo III com m.o.i. 1 e 10. Como controles positivos foram utilizados *S. aureus* (10^3 bactérias por poço), para TLR2, e LPS (100ng/mL), para TLR4. Também foi utilizado sobrenadante de C6/36 na qual o vírus foi multiplicado. Após 18h de incubação, as células foram coletadas e coradas com anticorpo (mouse mAb to human CD25, R-PE conjugate; Invitrogen). A leitura foi feita no citômetro FACScan (BD Biosciences) e as análises no software FlowJo. Os resultados foram apresentados como porcentagem da expressão de CD25 em células estimuladas menos porcentagem de expressão de CD25 em células não estimuladas. Histograma vermelho: células não estimuladas marcadas com anticorpo CD25 PE; Histograma azul: células estimuladas marcadas com anticorpo CD25 PE; TLR2-/TLR4-: células que não possuem TLR2 e TLR4 funcionais; TLR2+: células que possuem TLR2; TLR4+: células que possuem TLR4.

O DENV 3 genótipo I e também o genótipo III, causaram a ativação de TLR 2 nas duas m.o.i. utilizadas (1 e 10) (Figura 12). Porém, houve diferença na ativação, já que DENV 3 genótipo I causou maior ativação de TLR 2 que o genótipo III. É possível observar que, com a mesma m.o.i. 1, DENV 3 genótipo I causou a ativação, em nível de porcentagem, de 18% de TLR 2, duas vezes mais em relação ao genótipo III, que foi capaz de ativar somente 9%. Além disso, pelo resultado com a m.o.i. 10, podemos dizer que a ativação de TLR 2 é dependente da concentração de vírus. E ainda, com m.o.i. 10, DENV 3 genótipo I continuou causando maior nível de ativação de TLR 2 (41%) que o genótipo III (27%). Nenhum dos vírus provocou a ativação de TLR 4. Os sobrenadantes de células C6/36 nas quais os DENVs foram multiplicados não causaram a ativação de nenhum dos TLRs, comprovando que a ativação de TLR 2 foi causada exclusivamente pelos vírus.

5.2.2 Ativação de TLR 2 e/ou TLR 4 em células CHO que expressam TLR 2 e TLR 4 expostas aos ZIKV PE243 e SPH

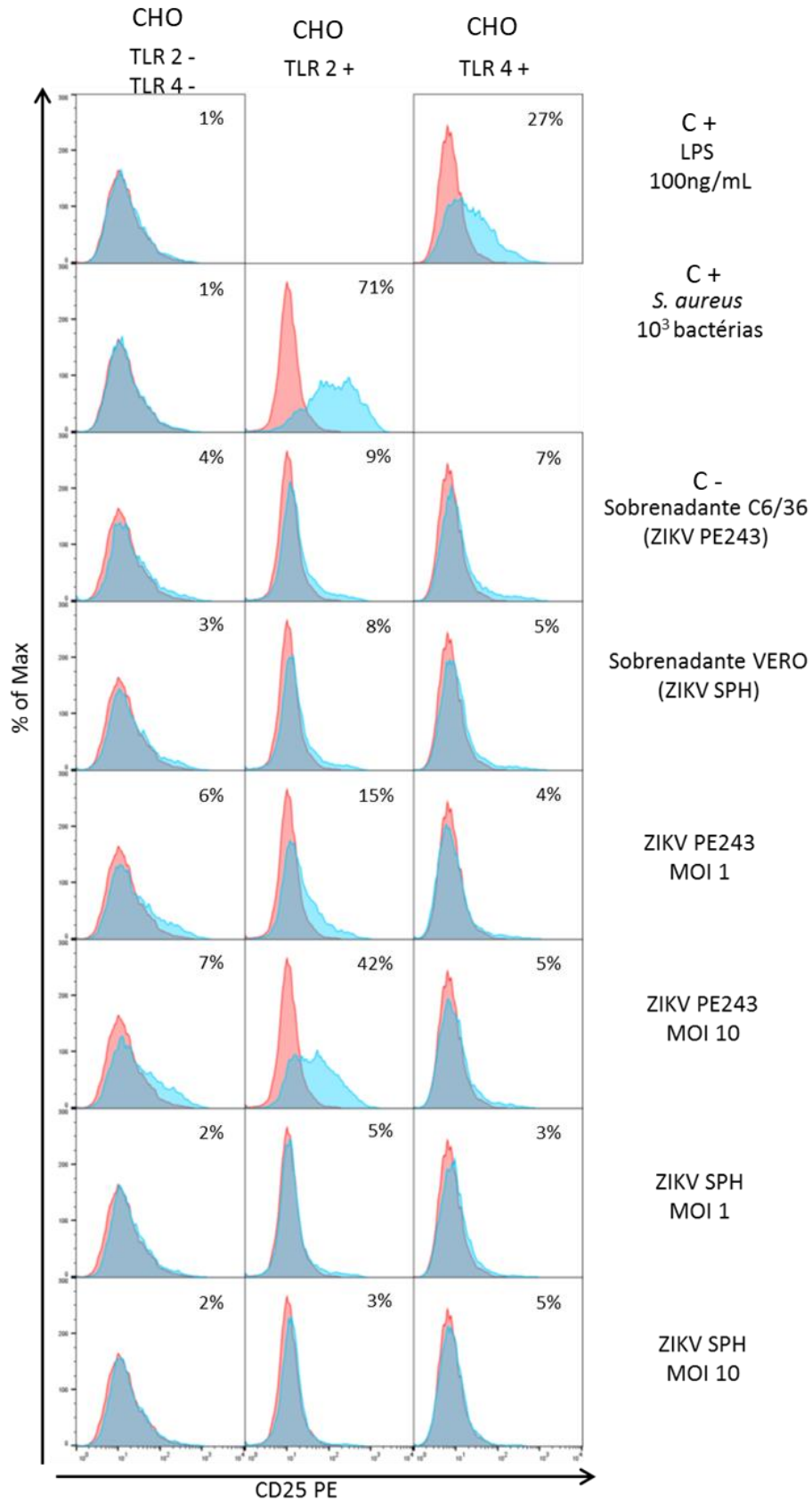


Figura 13: Ativação de TLR2 por ZIKV PE243. Células CHO transfetadas estavelmente com TLR2 (TLR2+), TLR 4 (TLR4+) ou com nenhum deles (TLR2- / TLR4-) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células por poço em placa de 24 poços. As células foram estimuladas com ZIKV PE243 e ZIKV SPH com m.o.i. 1 e 10. Como controles positivos foram utilizados *S. aureus* (10^3 bactérias por poço), para TLR2, e LPS (100ng/mL), para TLR4. Também foi utilizado sobrenadante de C6/36, na qual o ZIKV PE243 foi multiplicado e sobrenadante de VERO, na qual o ZIKV SPH foi multiplicado. Após 18h de incubação, as células foram coletadas e coradas com anticorpo (mouse mAb to human CD25, R-PE conjugate; Invitrogen). A leitura foi feita no citômetro FACScan (BD Biosciences) e as análises no software FlowJo. Os resultados foram apresentados como porcentagem da expressão de CD25 em células estimuladas menos porcentagem de expressão de CD25 em células não estimuladas. Histograma vermelho: células não estimuladas marcadas com anticorpo CD25 PE, Histograma azul: células estimuladas marcadas com anticorpo CD25 PE.

Somente o ZIKV PE243 provocou a ativação de TLR2, e esta ativação foi maior, em nível de porcentagem, com o m.o.i. mais alto. Este vírus ativou TLR2 em 15% com m.o.i. 1 e 42% com a m.o.i. 10. Já o ZIKV SPH não ativou TLR 2. Nenhum dos ZIKVs estudados provocou a ativação de TLR 4. Os sobrenadantes de células C6/36 e Vero ativaram TLR 2 em um nível basal, provando que a ativação de TLR 2 foi causada pelo ZIKV PE243 (Figura 13).

5.3 Cinética de produção de Óxido Nítrico (NO) em células infectadas THP-1, KG-1 e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

5.3.1 Cinética de produção de NO por células THP-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

Células THP-1 foram infectadas com DENV 3 genótipo I e DENV 3 genótipo III, com m.o.i. 1 e 10 (figura 14), e com ZIKV PE243 e ZIKV SPH, com m.o.i. 1 (figura 15), apenas devido ao fato de este vírus estar em concentração muito baixa. Os sobrenadantes das células infectadas com m.o.i. 1 de DENV foram coletados com 5, 9 e 14 dias após a infecção. E os sobrenadantes das células infectadas com m.o.i. 10 de DENV foram coletados com 2 e 9 dias após a infecção.

Já os sobrenadantes infectados com m.o.i. 1 de ZIKV foram coletados com 2, 5, 9 e 14 dias após a infecção. O óxido nítrico produzido pelas células foi quantificado por reação de Griess, segundo o protocolo de Drapier (1988). Antes da infecção, as células foram primadas com IFN γ (colocação de quantidade sub ótima de IFN γ , não capaz de ativar as células, mas importante para que as células sejam ativadas). Como controle positivo foi utilizada *E. coli* e como controles negativos foram utilizadas células não infectadas não primadas com IFN γ e células não infectadas primadas com IFN γ .

5.3.1.1 Células THP-1 não produzem NO após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III

Como mostrado na figura 16, nenhum dos vírus estimulou a produção de NO nas células THP-1 (Figuras 14 A e B) em nenhum dos dias pesquisados e com nenhuma m.o.i. utilizada.

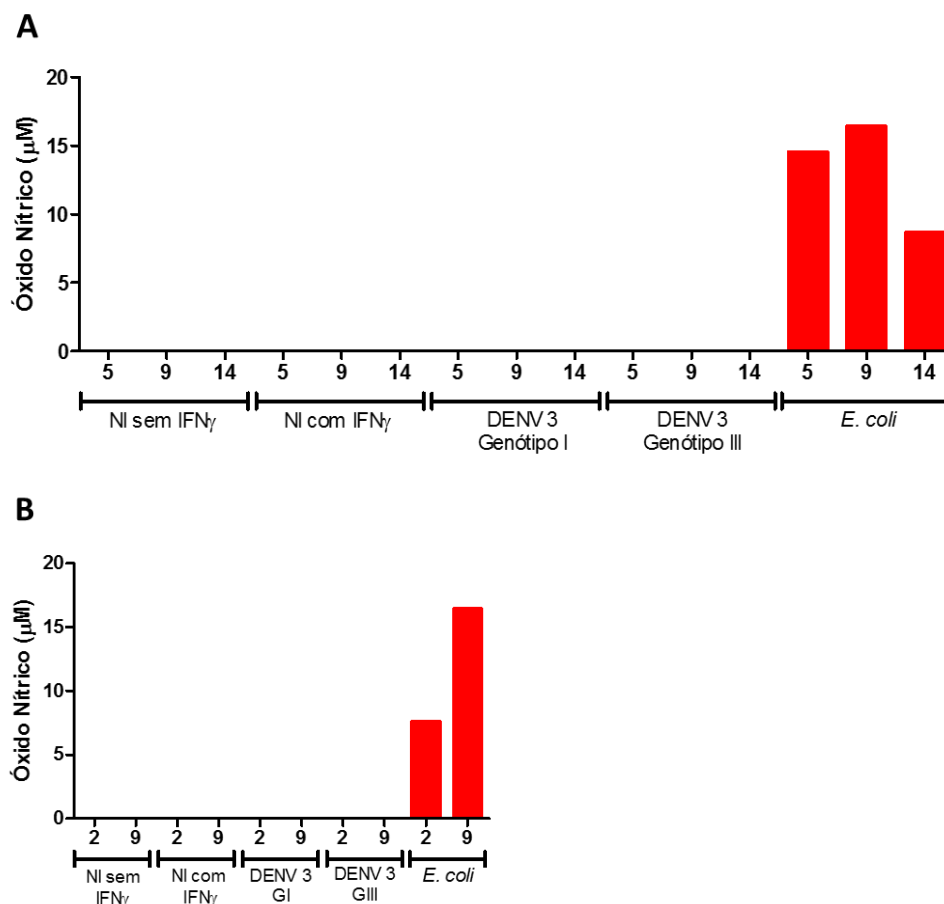


Figura 14: Cinética da produção de óxido nítrico em células THP-1 após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. 2×10^5 células THP-1 foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 2, 5, 9 e 14 dias após a infecção (d.p.i.) e a produção de óxido nítrico foi medida por reação de Griess segundo o protocolo de Drapier (1988). (A) Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 5, 9 e 14 d.p.i.. (B) Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 9 d.p.i.. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

5.3.1.2 Células THP-1 não produzem NO após infecção por células ZIKV PE243 e SPH

Como mostrado na figura 15, nenhum ZIKV foi capaz de estimular a produção de NO nas células THP-1 nos dias pesquisados com a m.o.i. utilizada (Figura 15).

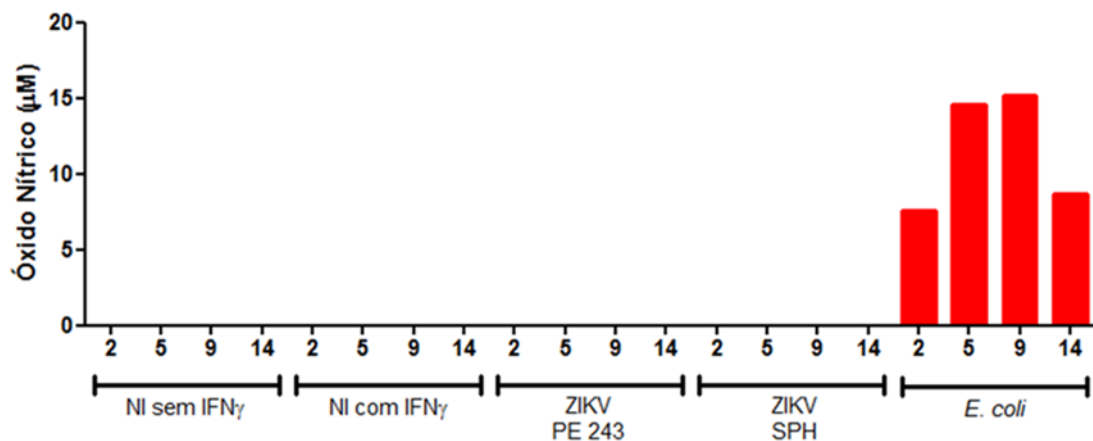


Figura 15: Cinética da produção de óxido nítrico em células THP-1 após infecção por ZIKV PE243 e SPH. 2×10^5 células THP-1 foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 2, 5, 9 e 14 dias após a infecção (d.p.i.) e a produção de óxido nítrico foi medida por reação de Griess, segundo protocolo de Drapier (1988).

Optamos por não fazer os demais experimentos com as células THP-1 (a quantificação de citocinas por CBA e a titulação dos sobrenadantes), pois estas células não produziram NO, mesmo com a infecção com m.o.i. 10. E ainda, com os sobrenadantes de células THP-1 foram feitos alguns ELISAs para IFN γ , IL-10 e IL-6, cujo resultado também foi negativo. Portanto, optamos em utilizar as células KG-1 e os macrófagos intraperitoneais de camundongos.

5.3.2 Cinética de produção de NO por células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

Células KG-1 foram infectadas com DENV 3 genótipo I e DENV 3 genótipo III, com m.o.i. 1 e 10 (Figura 16), e com ZIKV PE243 e ZIKV SPH, com m.o.i. 1 (Figura 17). Os sobrenadantes das células infectadas com m.o.i. 1 foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção. E os sobrenadantes das células infectadas com m.o.i. 10 foram coletados com 2 e 10 dias após a infecção. Antes da infecção, as células foram primadas com IFN γ . Como controle positivo foi utilizada *E. coli* e como controles negativos foram utilizadas células não infectadas não primadas com IFN γ e células não infectadas primadas com IFN γ . Os sobrenadantes dos grupos não infectados e do grupo estimulado com *E. coli* também foram coletados em todos os dias citados. Foi feita a reação de Griess para a quantificação de óxido nítrico produzido pelas células KG-1, segundo o protocolo de Drapier (1988).

5.3.2.1 Cinética de produção de NO em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Na figura 16 A, pode-se perceber que os vírus DENV genótipo I e genótipo III não estimularam a produção de NO nas células KG-1, quando infectadas com m.o.i. 1 nos dias pesquisados. No 2º d.p.i., mesmo com a infecção com m.o.i. 10, ambos os vírus não estimularam a produção de NO (Figura 16 B). Já no 10º d.p.i., com m.o.i. 10, os vírus estimularam a produção de NO (Figura 16 B). Porém, esta produção foi muito baixa, de aproximadamente 2 μ M para o genótipo I e 3 μ M para o genótipo III, enquanto as células infectadas com *E. coli*, neste mesmo dia, produziram aproximadamente 30 μ M. Não houve diferença na produção de NO pelas células infectadas com o genótipo I ou com o genótipo III.

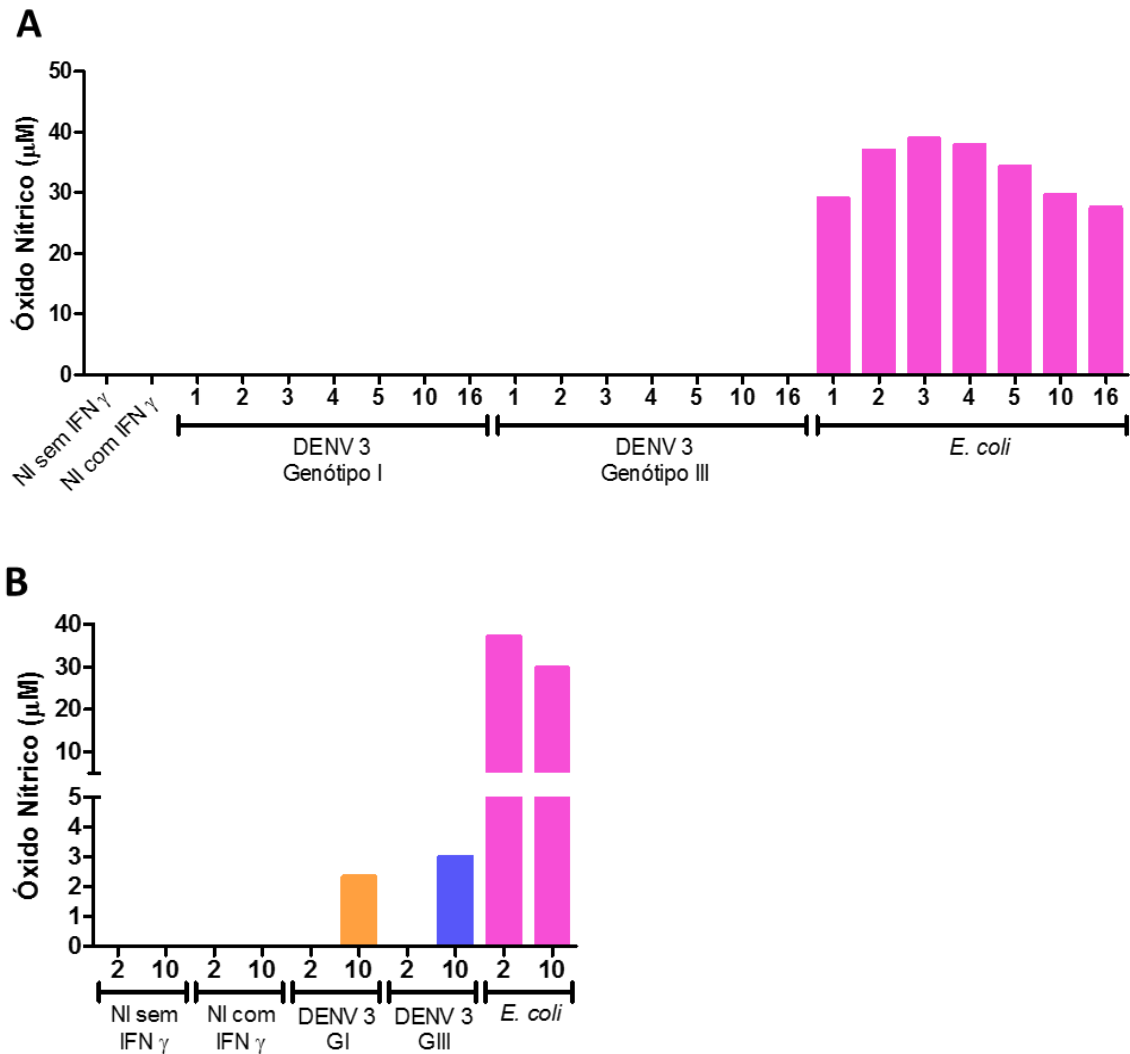


Figura 16: Cinética da produção de óxido nítrico em células KG-1 após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. 2×10^5 células KG-1 foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes de todos os grupos, inclusive dos grupos não infectados, foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e a produção de óxido nítrico foi medida por reação de Griess, segundo o protocolo de Drapier (1988). **(A)** Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 d.p.i.. Os grupos NI com e sem IFN γ estão representados por uma única barra, pois em todos os dias a produção de NO foi zero. **(B)** Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 10 d.p.i.. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

5.3.2.2 Cinética de produção de NO em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH

Como mostra a figura 17, nenhum dos ZIKV foi capaz de estimular a produção de NO nas células KG-1 nos dias pesquisados com a m.o.i. utilizada (Figura 17).

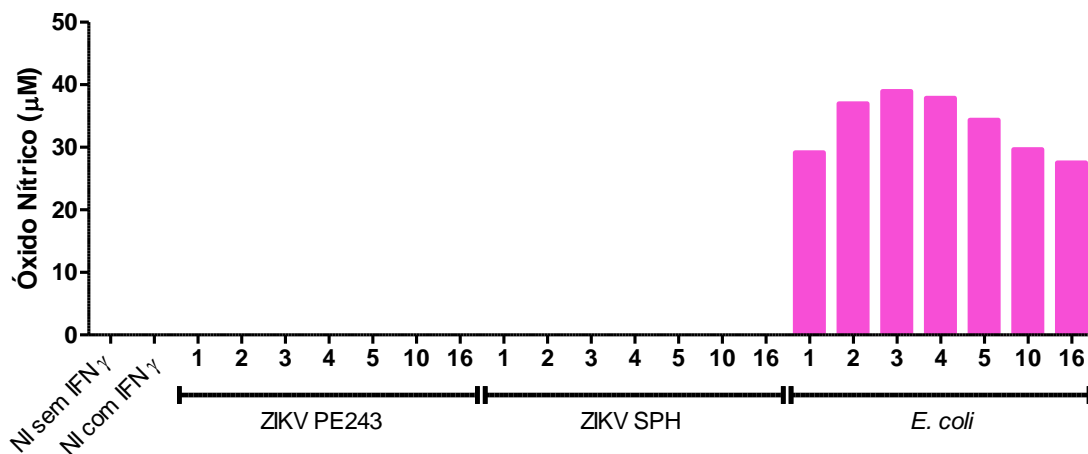


Figura 17: Cinética da produção de óxido nítrico em células KG-1 após infecção por ZIKV PE243 e SPH. 2×10^5 células KG-1 foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e a produção de óxido nítrico foi medida por reação de Griess, segundo protocolo de Drapier (1988).

5.3.3 Cinética de produção de NO por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 WT infectados com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 foram coletados após 4 dias de estímulo com tioglicolato a 3%. Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços, primados com IFN γ e infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III, com m.o.i. 1 e 10 (figura 28), e com ZIKV PE243 e ZIKV SPH, com m.o.i. 1 (Figura 19). Os sobrenadantes das células infectadas com m.o.i. 1 foram coletados 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção,

inclusive os sobrenadantes dos grupos não infectados. E os sobrenadantes das células infectadas com m.o.i. 10 foram coletados com 2 e 10 dias após a infecção. Foi utilizado um grupo estimulado com *E. coli* para controle positivo. E como controles negativos, foram utilizados um grupo de macrófagos não infectados e não estimulados com IFN γ e um grupo não infectado e estimulado com IFN γ .

5.3.3.1 Cinética de produção de NO em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 WT infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Na Figura 18, foi possível inferir que a produção de NO nos macrófagos intraperitoneais infectados com m.o.i. 1 dos dois vírus foi semelhante do 2º ao 16º d.p.i.. Também foi possível perceber que houve diferença na produção de NO pelos macrófagos intraperitoneais em relação à m.o.i. utilizada na infecção, sendo que macrófagos infectados com m.o.i. 10 (Figura 18 B) produziram mais NO que macrófagos infectados com m.o.i. 1 (Figura 18 A). Esta relação entre m.o.i. e produção de NO foi observada tanto para DENV 3 genótipo I quanto para DENV 3 genótipo III. E ainda, ocorreu maior produção de NO pelos macrófagos intraperitoneais com m.o.i. 10 no 10º d.p.i. em comparação ao 2º d.p.i., o que também ocorreu com os dois genótipos de DENV estudados (Figura 18 B). Assim, não houve diferença entre a produção de NO estimulada por DENV 3 genótipo I em comparação a DENV 3 genótipo III nos macrófagos intraperitoneais em nenhum dos dias estudados e com nenhuma m.o.i. utilizada.

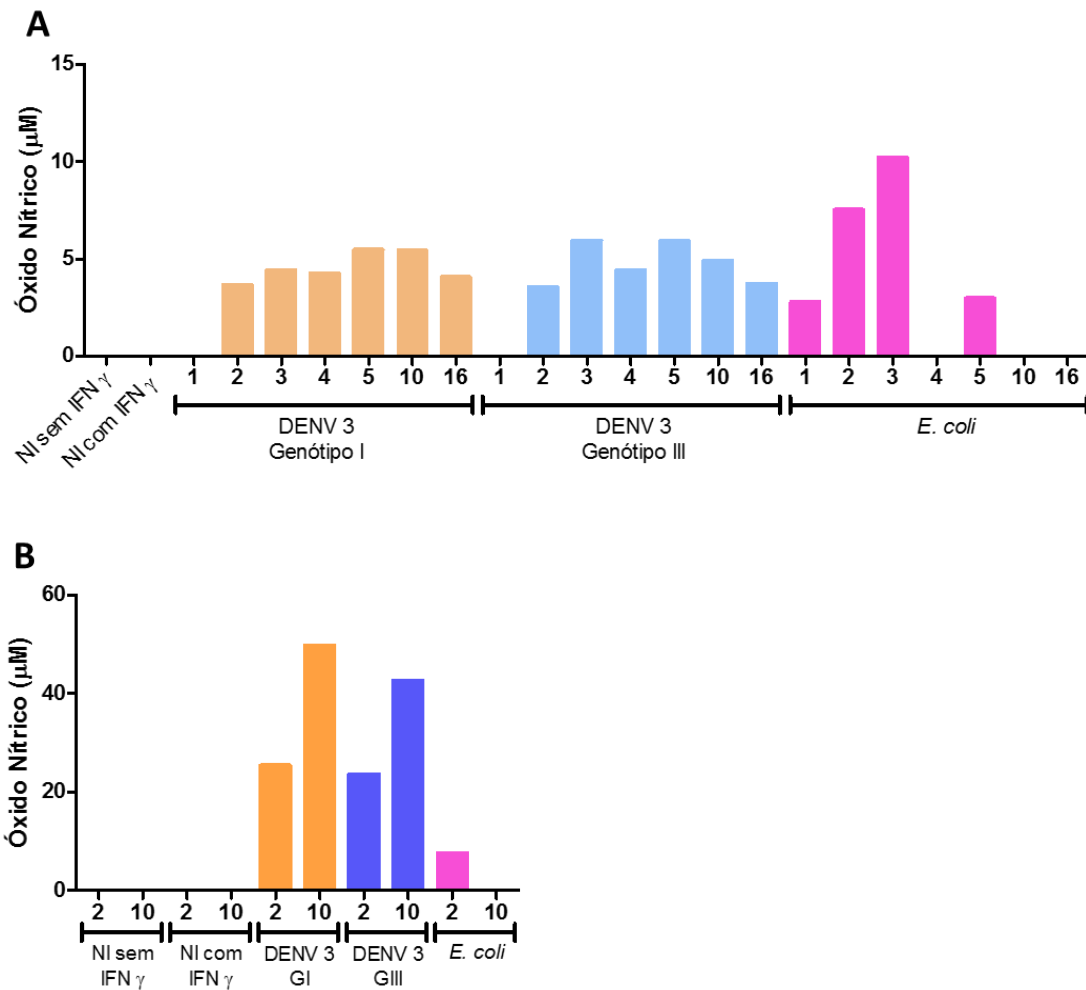


Figura 18: Cinética da produção de óxido nítrico em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e DENV 3 genótipo III. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes de todos os grupos, inclusive dos grupos não infectados, foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e a produção de óxido nítrico foi medida por reação de Griess, segundo protocolo de Drapier (1988). **(A)** Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 d.p.i.. Os grupos NI com e sem IFN γ estão representados por uma única barra, pois em todos os dias a produção de NO foi zero. **(B)** Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 10 d.p.i.. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

5.3.3.2 Cinética de produção de NO em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 WT infectados com ZIKV PE243 e SPH

Somente ZIKV PE243 estimulou a produção de NO nos macrófagos intraperitoneais, sendo que esta produção foi crescendo do primeiro até o 3º d.p.i., quando então ficou estável. ZIKV SPH não estimulou a produção de NO nos dias pesquisados com a m.o.i. utilizada (Figura 19).

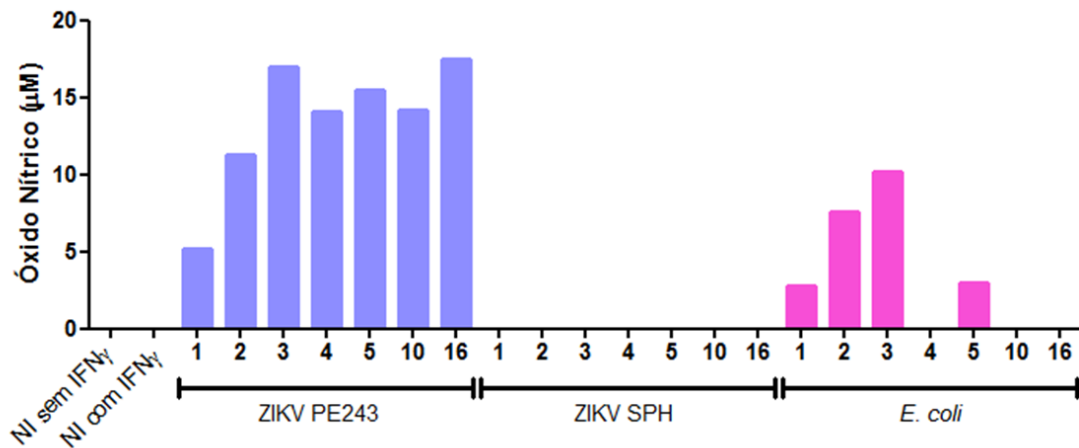


Figura 19: Cinética da produção de óxido nítrico em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” ($n = 5$) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e a produção de óxido nítrico foi medida por reação de Griess, segundo protocolo de Drapier (1988).

5.3.4 Cinética de produção de citocinas em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

A presença das citocinas IFN γ , TNF, IL-6, e IL-10 nos sobrenadantes das células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH foi analisada por CBA (Human Flex Set - BD Biosciences).

Porém, não foi detectada a produção das citocinas citadas acima pelo método utilizado, com exceção de IL-6, a qual foi produzida somente na infecção por ZIKV SPH (figura 20). As demais citocinas, apresentaram uma intensidade média de fluorescência (MFI) muito baixa, como é possível perceber nas tabelas 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, sendo assim considerado que não houve a produção destas citocinas.

5.3.4.1 Cinética da produção de IFN γ

a. Cinética da produção de IFN γ em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Como é possível perceber na tabela 3, não foi detectada produção de IFN γ nas células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção pesquisador e com as m.o.i. 1 e 10 utilizadas.

Tabela 3: Produção de IFN γ em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.

	IFN γ		
	Amostras	MFI	pg/mL
m.o.i. 1			
	NI sem IFN γ	2,84	-
	NI com IFN γ	2,38	-
1° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,55	-
	DENV 3 genótipo III	2,7	-
	<i>E.coli</i>	2,62	-
	NI sem IFN γ	2,72	-
	NI com IFN γ	2,84	-
2° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,75	-
	DENV 3 genótipo III	2,75	-
	<i>E.coli</i>	2,62	-
	NI sem IFN γ	2,6	-
	NI com IFN γ	2,55	-
3° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,85	-
	DENV 3 genótipo III	2,65	-
	<i>E.coli</i>	2,82	-
	NI sem IFN γ	3,22	-
	NI com IFN γ	2,91	-
4° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,01	-
	DENV 3 genótipo III	2,41	-
	<i>E.coli</i>	2,89	-
	NI sem IFN γ	2,55	-
	NI com IFN γ	2,85	-
5° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,01	-
	DENV 3 genótipo III	2,85	-
	<i>E.coli</i>	3,1	-
	NI sem IFN γ	2,75	-
	NI com IFN γ	2,92	-
10° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,8	-
	DENV 3 genótipo III	2,92	-
	<i>E.coli</i>	2,91	-
	NI sem IFN γ	2,55	-
	NI com IFN γ	3,09	-
16° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,03	-
	DENV 3 genótipo III	2,79	-
	<i>E.coli</i>	2,89	-
m.o.i. 10			
2° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,18	-
	DENV 3 genótipo III	2,72	-
10° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,03	-
	DENV 3 genótipo III	2,79	-

b. Cinética da produção de IFN γ em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH

Como é possível perceber na tabela 4, não foi detectada produção de IFN γ nas células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção pesquisados e com as m.o.i. 1 utilizada.

Tabela 4: Produção de IFN γ em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH.

	IFN γ		
	Amostras	MFI	pg/mL
m.o.i. 1			
1° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,84	-
	NI com IFN γ	2,38	-
	ZIKV PE243	2,4	-
	ZIKV SPH	2,6	-
	<i>E.coli</i>	2,62	-
2° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,72	-
	NI com IFN γ	2,84	-
	ZIKV PE243	2,85	-
	ZIKV SPH	2,75	-
	<i>E.coli</i>	2,62	-
3° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,6	-
	NI com IFN γ	2,55	-
	ZIKV PE243	2,82	-
	ZIKV SPH	2,68	-
	<i>E.coli</i>	2,82	-
4° d.p.i.	NI sem IFN γ	3,22	-
	NI com IFN γ	2,91	-
	ZIKV PE243	2,67	-
	ZIKV SPH	2,62	-
	<i>E.coli</i>	2,89	-
5° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,55	-
	NI com IFN γ	2,85	-
	ZIKV PE243	2,82	-
	ZIKV SPH	2,8	-
	<i>E.coli</i>	3,1	-
10° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,75	-
	NI com IFN γ	2,92	-
	ZIKV PE243	3,1	-
	ZIKV SPH	2,79	-
	<i>E.coli</i>	2,91	-
16° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,55	-
	NI com IFN γ	3,09	-
	ZIKV PE243	2,7	-
	ZIKV SPH	3	-
	<i>E.coli</i>	2,89	-

5.3.4.2 Cinética da produção de TNF

a. Cinética da produção de TNF em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Como é possível perceber na tabela 5, não foi detectada produção de TNF nas células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção pesquisados e com as m.o.i. 1 e 10 utilizadas.

Tabela 5: Produção de TNF em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.

		TNF	
		Amostras	MFI pg/mL
m.o.i. 1			
1° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,15	-
	NI com IFN γ	1,92	-
	DENV 3 genótipo I	2,49	-
	DENV 3 genótipo III	2,29	-
	<i>E.coli</i>	2,19	-
2° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,62	-
	NI com IFN γ	2,62	-
	DENV 3 genótipo I	2,28	-
	DENV 3 genótipo III	2,31	-
	<i>E.coli</i>	2,28	-
3° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,51	-
	NI com IFN γ	2,43	-
	DENV 3 genótipo I	2,57	-
	DENV 3 genótipo III	2,55	-
	<i>E.coli</i>	2,32	-
4° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,37	-
	NI com IFN γ	2,02	-
	DENV 3 genótipo I	3	0,03
	DENV 3 genótipo III	2,77	0
	<i>E.coli</i>	2,92	0,02
5° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,68	-
	NI com IFN γ	2,08	-
	DENV 3 genótipo I	2,65	-
	DENV 3 genótipo III	2,72	0
	<i>E.coli</i>	3,03	-
10° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,82	0
	NI com IFN γ	2,85	0,01
	DENV 3 genótipo I	2,11	-
	DENV 3 genótipo III	2,65	-
	<i>E.coli</i>	2,55	-
16° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,49	-
	NI com IFN γ	2,82	0
	DENV 3 genótipo I	2,62	-
	DENV 3 genótipo III	2,64	-
	<i>E.coli</i>	2,32	-
m.o.i. 10			
2° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,85	0,01
	DENV 3 genótipo III	2,87	0,01
10° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,64	-
	DENV 3 genótipo III	2,19	-

b. Cinética da produção de TNF em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH

Como é possível perceber na tabela 6, não foi detectada produção de TNF nas células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção e com as m.o.i. 1 utilizada.

Tabela 6: Produção de TNF em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH.

	TNF		
	Amostras	MFI	pg/mL
m.o.i. 1			
1° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,15	-
	NI com IFN γ	1,92	-
	ZIKV PE243	2,52	-
	ZIKV SPH	2,49	-
	<i>E.coli</i>	2,19	-
2° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,62	-
	NI com IFN γ	2,62	-
	ZIKV PE243	2,96	0,02
	ZIKV SPH	2,34	-
	<i>E.coli</i>	2,28	-
3° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,51	-
	NI com IFN γ	2,43	-
	ZIKV PE243	2,68	-
	ZIKV SPH	2,49	-
	<i>E.coli</i>	2,32	-
4° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,37	-
	NI com IFN γ	2,02	-
	ZIKV PE243	2,46	-
	ZIKV SPH	2,52	-
	<i>E.coli</i>	2,92	0,02
5° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,68	-
	NI com IFN γ	2,08	-
	ZIKV PE243	2,4	-
	ZIKV SPH	2,75	0
	<i>E.coli</i>	3,03	-
10° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,82	0
	NI com IFN γ	2,85	0,01
	ZIKV PE243	2,75	0
	ZIKV SPH	2,4	-
	<i>E.coli</i>	2,55	-
16° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,49	-
	NI com IFN γ	2,82	0
	ZIKV PE243	2,62	-
	ZIKV SPH	2,64	-
	<i>E.coli</i>	2,32	-

5.3.4.3 Cinética da produção de IL-6

a. Cinética da produção de IL-6 em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Como é possível perceber na tabela 7, não foi detectada produção de IL-6 nas células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção pesquisados e com as m.o.i. 1 e 10 utilizadas.

Tabela 7: Produção de IL-6 em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.

	IL-6		
	Amostras	MFI	pg/mL
m.o.i. 1			
1° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,65	0
	NI com IFN γ	2,34	0
	DENV 3 genótipo I	2,79	0
	DENV 3 genótipo III	2,62	0
	<i>E.coli</i>	2,37	0
2° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,7	0
	NI com IFN γ	2,72	0
	DENV 3 genótipo I	2,31	0
	DENV 3 genótipo III	2,54	0
	<i>E.coli</i>	2,55	0
3° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,19	0
	NI com IFN γ	2,48	0
	DENV 3 genótipo I	2,51	0
	DENV 3 genótipo III	2,79	0
	<i>E.coli</i>	2,51	0
4° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,62	0
	NI com IFN γ	2,52	0
	DENV 3 genótipo I	2,96	0
	DENV 3 genótipo III	2,41	0
	<i>E.coli</i>	2,37	0
5° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,49	0
	NI com IFN γ	2,65	0
	DENV 3 genótipo I	2,67	0
	DENV 3 genótipo III	2,82	0
	<i>E.coli</i>	2,75	0
10° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,4	0
	NI com IFN γ	2,41	0
	DENV 3 genótipo I	2,05	0
	DENV 3 genótipo III	3,07	0
	<i>E.coli</i>	2,85	0
16° d.p.i.	NI sem IFN γ	2,55	0
	NI com IFN γ	2,29	0
	DENV 3 genótipo I	2,59	0
	DENV 3 genótipo III	2,59	0
	<i>E.coli</i>	2,43	0
m.o.i. 10			
2° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,68	0
	DENV 3 genótipo III	2,79	0
10° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	2,75	0
	DENV 3 genótipo III	2,62	0

b. Cinética da produção de IL-6 em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH

Somente o ZIKV SPH estimulou a produção de IL-6 nas células KG-1. A produção ocorreu em todos os dias após a infecção e foi maior no 16º d.p.i. (Figura 20).

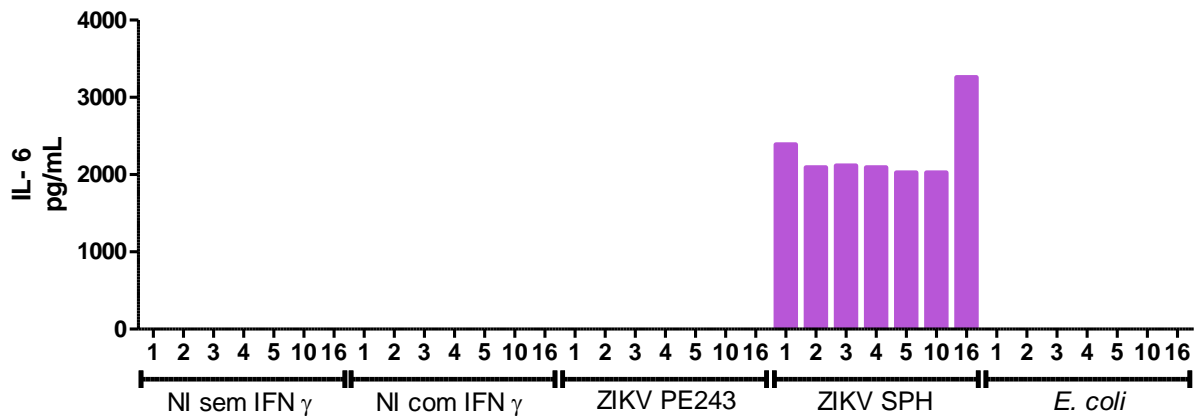


Figura 20: Níveis de IL-6 produzido por células KG-1 após infecção por ZIKV PE243 e SPH. 2×10^5 células KG-1 foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IL-6 produzidos foram quantificados por CBA (Human Flex Set - BD Biosciences).

5.3.4.4 Cinética da produção de IL-10

a. Cinética da produção de IL-10 em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Como é possível perceber na tabela 8, não foi detectada produção de IL-10 nas células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção pesquisados e com as m.o.i. 1 e 10 utilizadas.

Tabela 8: Produção de IL-10 em células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I e genótipo III.

	IL-10		
	Amostras	MFI	pg/mL
m.o.i. 1			
	NI sem IFN γ	3,98	-
	NI com IFN γ	3,33	-
1° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,7	-
	DENV 3 genótipo III	3,7	-
	<i>E.coli</i>	3,78	-
	NI sem IFN γ	4,19	-
	NI com IFN γ	3,83	-
2° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,7	-
	DENV 3 genótipo III	4	-
	<i>E.coli</i>	3,83	-
	NI sem IFN γ	4,19	-
	NI com IFN γ	4,14	-
3° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	4	-
	DENV 3 genótipo III	3,61	-
	<i>E.coli</i>	3,94	-
	NI sem IFN γ	4,05	-
	NI com IFN γ	4,09	-
4° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	4,62	-
	DENV 3 genótipo III	3,78	-
	<i>E.coli</i>	4	-
	NI sem IFN γ	4,52	-
	NI com IFN γ	3,49	-
5° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,94	-
	DENV 3 genótipo III	4	-
	<i>E.coli</i>	3,96	-
	NI sem IFN γ	3,87	-
	NI com IFN γ	3,26	-
10° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,76	-
	DENV 3 genótipo III	3,53	-
	<i>E.coli</i>	3,35	-
	NI sem IFN γ	3	-
	NI com IFN γ	3,29	-
16° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,78	-
	DENV 3 genótipo III	4,16	-
	<i>E.coli</i>	3,76	-
m.o.i. 10			
2° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	4,16	-
	DENV 3 genótipo III	3,61	-
10° d.p.i.	DENV 3 genótipo I	3,66	-
	DENV 3 genótipo III	3,74	-

b. Cinética da produção de IL-10 em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH

Como é possível perceber na tabela 9, não foi detectada produção de IL-10 nas células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 após a infecção pesquisados e com as m.o.i. 1 utilizada.

Tabela 9: Produção de IL-10 em células KG-1 infectadas com ZIKV PE243 e SPH.

	IL-10		
	Amostras	MFI	pg/mL
m.o.i. 1			
1° d.p.i.	NI sem IFN γ	3,98	-
	NI com IFN γ	3,33	-
	ZIKV PE243	3,78	-
	ZIKV SPH	3,33	-
	<i>E.coli</i>	3,78	-
2° d.p.i.	NI sem IFN γ	4,19	-
	NI com IFN γ	3,83	-
	ZIKV PE243	3,98	-
	ZIKV SPH	3,91	-
	<i>E.coli</i>	3,83	-
3° d.p.i.	NI sem IFN γ	4,19	-
	NI com IFN γ	4,14	-
	ZIKV PE243	3,78	-
	ZIKV SPH	3,61	-
	<i>E.coli</i>	3,94	-
4° d.p.i.	NI sem IFN γ	4,05	-
	NI com IFN γ	4,09	-
	ZIKV PE243	3,45	-
	ZIKV SPH	3,91	-
	<i>E.coli</i>	4	-
5° d.p.i.	NI sem IFN γ	4,52	-
	NI com IFN γ	3,49	-
	ZIKV PE243	3,74	-
	ZIKV SPH	3,7	-
	<i>E.coli</i>	3,96	-
10° d.p.i.	NI sem IFN γ	3,87	-
	NI com IFN γ	3,26	-
	ZIKV PE243	3,61	-
	ZIKV SPH	3,45	-
	<i>E.coli</i>	3,35	-
16° d.p.i.	NI sem IFN γ	3	-
	NI com IFN γ	3,29	-
	ZIKV PE243	3,53	-
	ZIKV SPH	3,83	-
	<i>E.coli</i>	3,76	-

5.3.5 Cinética de produção de citocinas em macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

A presença das citocinas IFN γ , TNF, IL-6, MCP-1 e IL-10 nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III (Figuras 23, 25, 27, 29, 31), ZIKV PE243 e ZIKV SPH (Figuras 24, 26, 28, 30, 32) foi determinada por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Bioscience).

5.3.5.1 Cinética da produção de IFN γ

a. Cinética da produção de IFN γ em macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Em relação à infecção com os vírus com m.o.i. 1 (Figura 21 A), o IFN γ foi produzido apenas no primeiro dia após a infecção, quando comparado com o não infectado primado com IFN, tanto com o genótipo tipo I quanto com o genótipo tipo III. Já os macrófagos infectados com m.o.i. 10 do genótipo I (Figura 21 B), apresentaram produção de IFN γ no décimo dia após a infecção, sendo que macrófagos infectados com com genótipo III não produziram, já que estes possuem valor semelhante ao IFN γ detectado nos macrófagos não infectados estimulados com IFN γ .

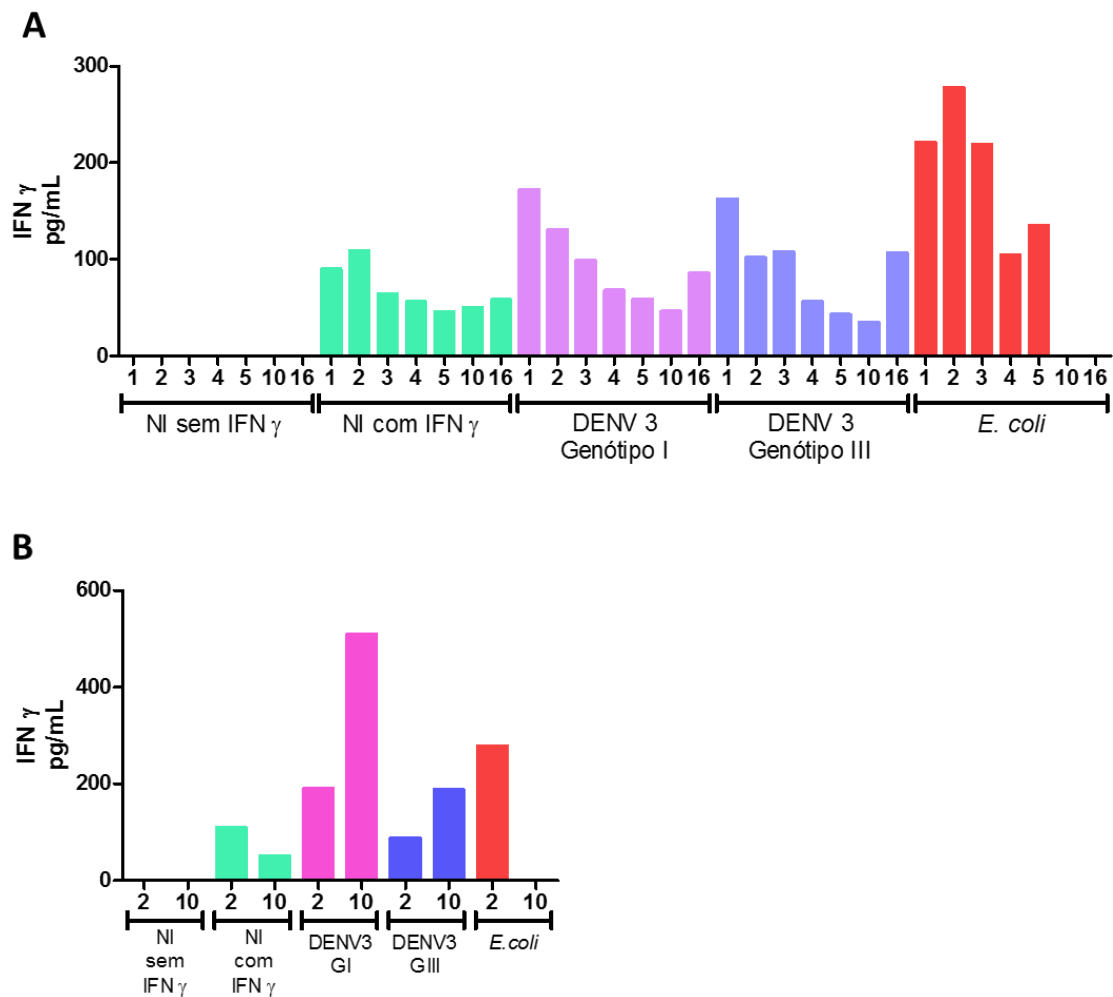


Figura 21: Níveis de IFN γ produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IFN γ produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences). **(A)** Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 d.p.i.. **(B)** Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 10 d.p.i.. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

b. Cinética da produção de IFN γ em macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e SPH

Como mostra a figura 22, não houve produção de IFN γ em macrófagos intraperitoneais infectados com as duas amostras de ZIKV (Figura 24).

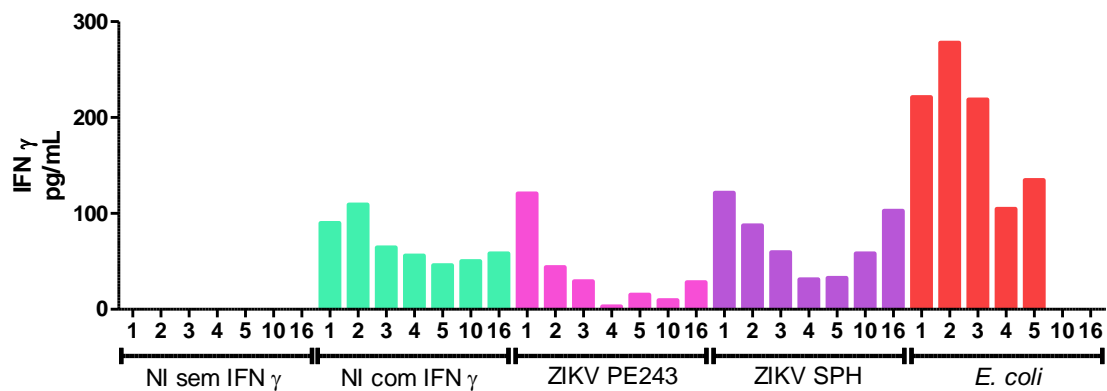


Figura 22: Níveis de IFN γ produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IFN γ produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences).

5.3.5.2 Cinética da produção de TNF

a. Cinética da produção de TNF em macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Ocorreu a produção de TNF pelos macrófagos infectados com m.o.i. 1 de DENV em todos os dias pesquisados nos (Figura 23 A). Os macrófagos infectados com genótipo I produziram quantidade similar de TNF em comparação aos macrófagos infectados com genótipo III, nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 10 após a infecção. A produção de TNF é maior do 1º ao 5º d.p.i. nos macrófagos infectados com ambos os vírus, em comparação com os outros d.p.i e no 10º d.p.i a produção começa a diminuir, sendo ainda menor no 16º d.p.i..

Já nos macrófagos infectados com m.o.i. 10 (Figura 23 B), a produção de TNF foi maior nos macrófagos infectados com o genótipo III e genótipo I no 2º d.p.i. em comparação com o 10º d.p.i.. Porém, no 10º d.p.i. não ocorreu mais a produção desta citocina nos macrófagos infectados com o genótipo III, enquanto os macrófagos infectados com o genótipo I continuaram produzindo, mesmo que em menor valor em comparação ao valor produzido no 2º d.p.i.

Os macrófagos infectados com DENV com m.o.i 1 ou m.o.i. 10 produziram TNF de maneira similar.

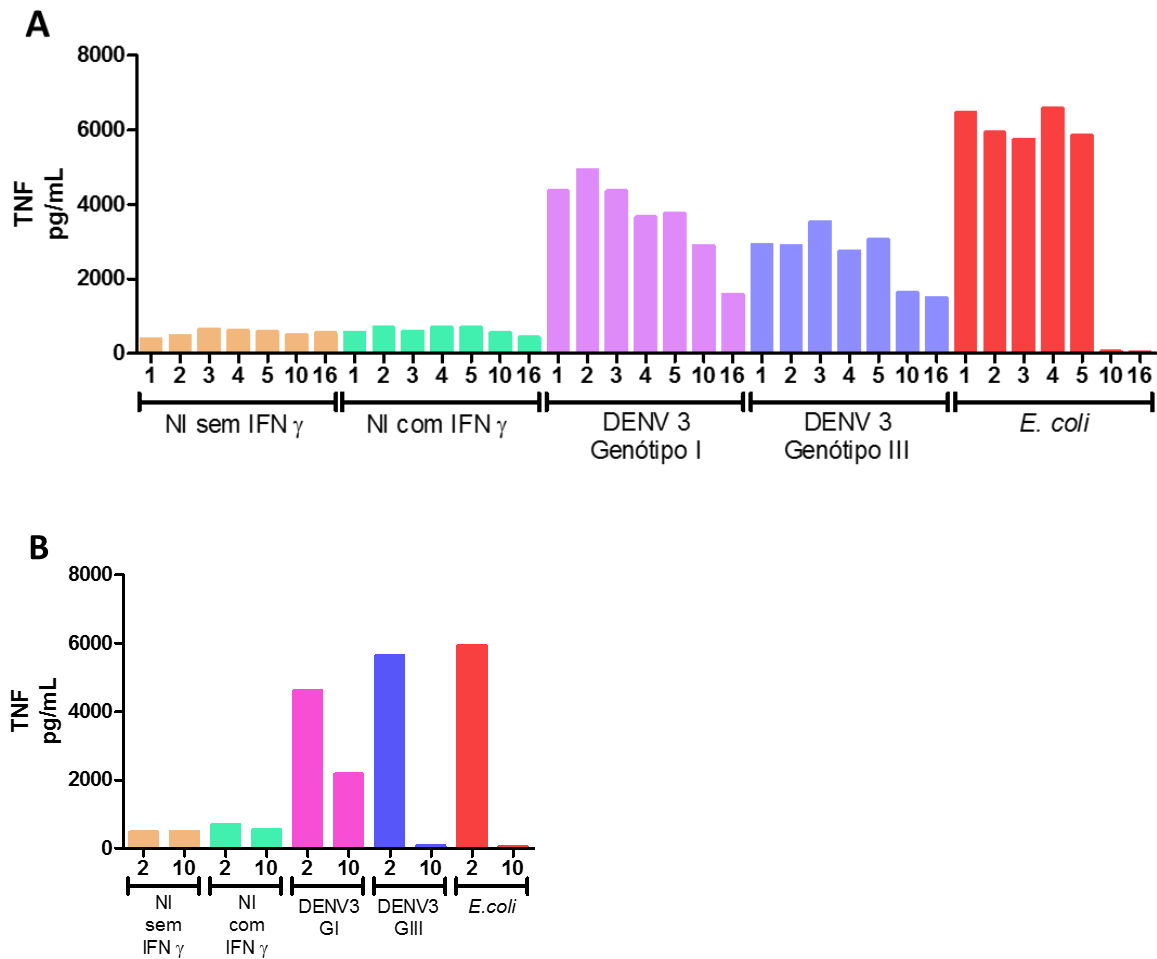


Figura 23: Níveis de TNF produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” ($n = 5$) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ ($10 \text{ U}/\mu\text{L}$), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de TNF produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences). (A) Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 d.p.i.. (B) Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 10 d.p.i.. NI : não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

b. Cinética da produção de TNF em macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e SPH

Ocorreu maior produção de TNF nos macrófagos infectados com ZIKV PE243, principalmente do 1° ao 5° d.p.i., pois a partir do 10° e 16° d.p.i. a produção começou a diminuir. Não houve produção de TNF nos macrófagos infectados com ZIKV SPH (Figura 24).

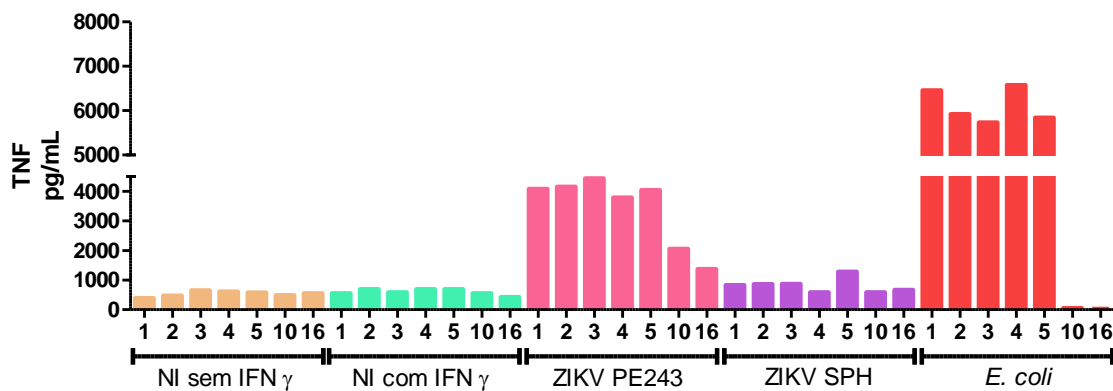


Figura 24: Níveis de TNF produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de TNF produzidos foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences).

5.3.5.3 *Cinética da produção de IL-6*

a. Cinética da produção de IL-6 em macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Ocorreu diferença na produção de IL-6 entre os macrófagos infectados com os dois vírus, sendo que macrófagos infectados com genótipo I, com m.o.i. 1, produziram mais IL-6 que macrófagos infectados com o genótipo III (Figura 25 A). Não ocorreu a produção de IL-6 no 1º d.p.i. de nenhum dos DENV. Já nos outros dias, DENV 3 genótipo I estimula a produção de IL-6, sendo que no 2º e 3º d.p.i. a produção foi semelhante, no 4º d.p.i. ocorreu um pequeno aumento e no 5º d.p.i. o aumento foi maior. Já no 10º d.p.i. houve um decréscimo na produção de IL-6, a qual voltou a aumentar no 16º d.p.i. (Figura 25 A). Quanto aos macrófagos infectados com o genótipo III, no 2º, 3º, 4º, 5º e 16º d.p.i. ocorreu produção de IL-6, mas esta produção foi menor em comparação aos macrófagos infectados com o genótipo I.

Quanto aos macrófagos infectados com m.o.i. 10 (Figura 25 B), não houve diferença na produção de IL-6 entre os genótipos no 2º d.p.i.. Também não houve diferença na produção desta citocina entre o 2º e 10º d.p.i., nos macrófagos infectados com genótipo I. Já os macrófagos infectados com genótipo III, no 10º d.p.i., produziram mais IL-6 em comparação ao 2º d.p.i.. E ainda, macrófagos infectados com o genótipo III, no 10º d.p.i., produziram mais IL-6 que macrófagos infectados com o genótipo I.

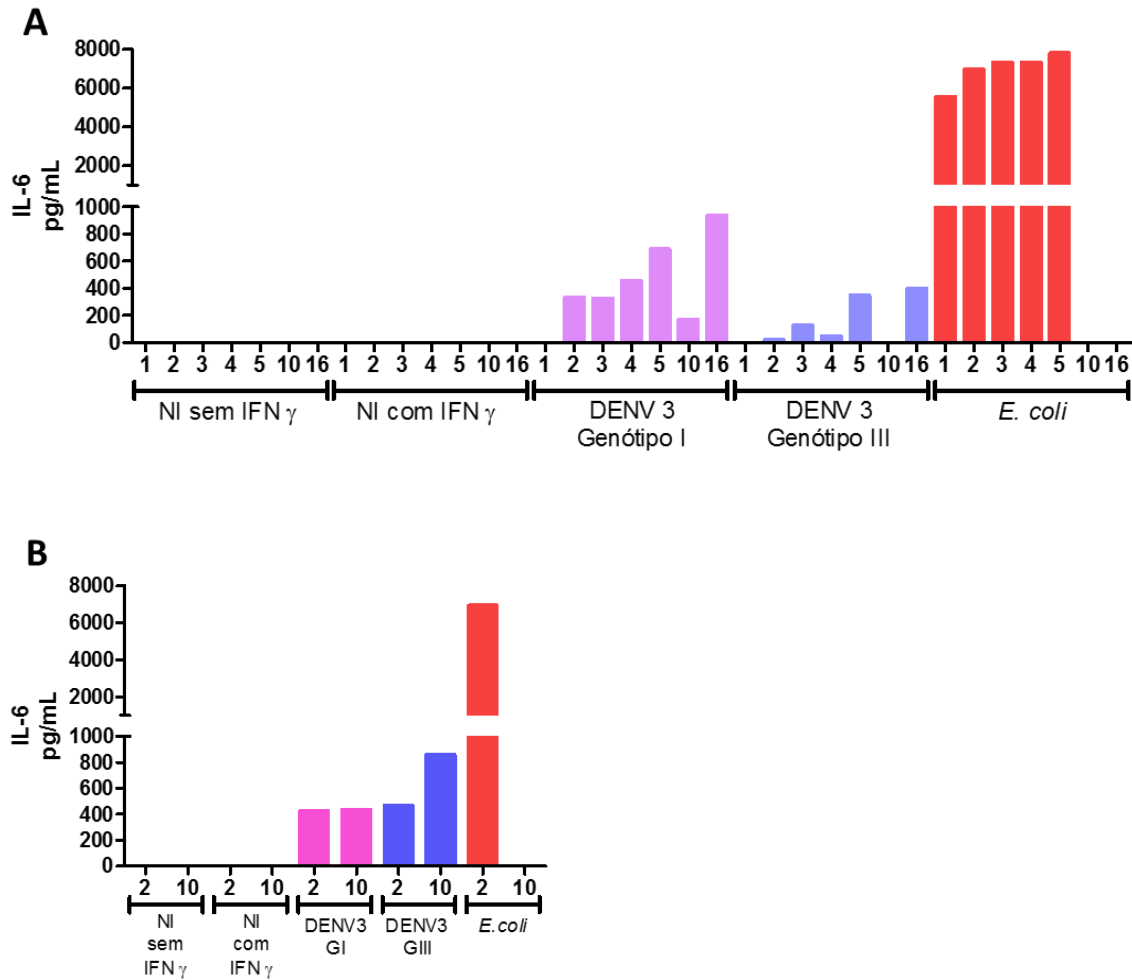


Figura 25: Níveis de IL-6 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” ($n = 5$) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço em placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IL-6 produzidos foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences). **(A)** Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 d.p.i.. **(B)** Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 10 d.p.i.. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

b. Cinética da produção de IL-6 em macrófagos intraperitoneais infectados infectadas com ZIKV PE243 e SPH

Os macrófagos infectados com ZIKV SPH só produziram IL-6 no 5º d.p.i., e em baixa quantidade quando comparado ao 5º d.p.i. dos macrófagos infectados com ZIKV PE243. Enquanto que os macrófagos infectados com ZIKV PE243 produziram IL-6 em praticamente todos os dias, com exceção do 2º d.p.i.. Nestes macrófagos, no 1º e 3º d.p.i. ocorreu a produção de IL-6, mesmo que em pouca quantidade, já no 4º d.p.i. ocorreu um aumento na produção com o pico de produção no 5º d.p.i.. E, no 10º d.p.i. ocorreu uma queda brusca, com um aumento na produção de IL-6 no 16º d.p.i. (Figura 26).

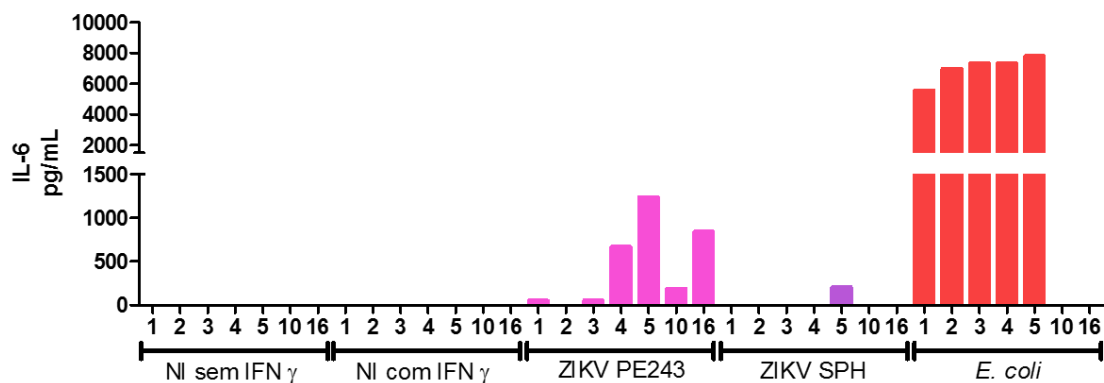


Figura 26: Níveis de IL-6 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IL-6 produzidos foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences).

5.3.5.4 Cinética da produção de IL-10

a. Cinética da produção de IL-10 em macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Os macrófagos infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III não produziram IL-10 em nenhum dos dias pesquisados e com nenhuma m.o.i. utilizada (Figura 27)

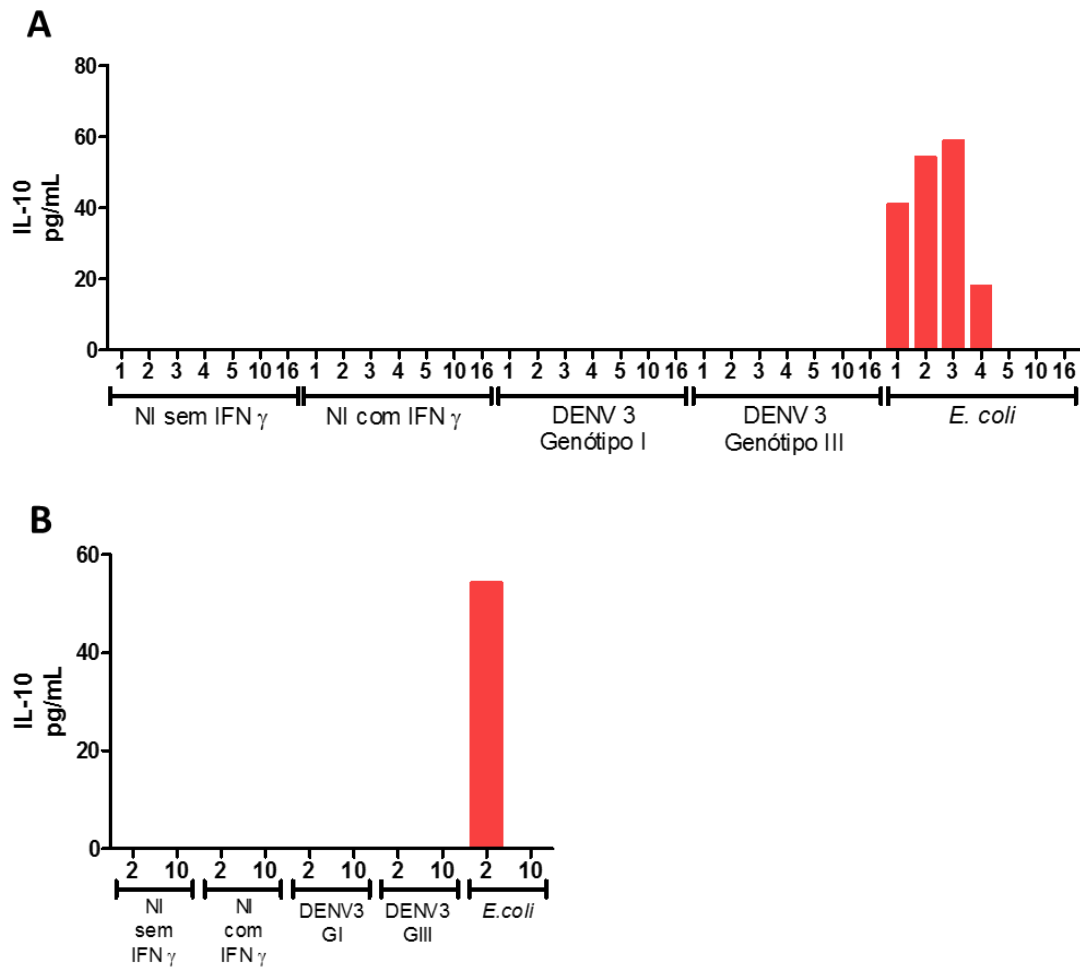


Figura 27: Níveis de IL-10 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com Tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IL-10 produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences). **(A)** Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias p.i.. **(B)** Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 d.p.i. e 10. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

b. Cinética da produção de IL-10 em macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e SPH

Os macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e ZIKV SPH não produziram IL-10 nos dias pesquisados e com a m.o.i. utilizada (m.o.i. 1) (Figura 28).

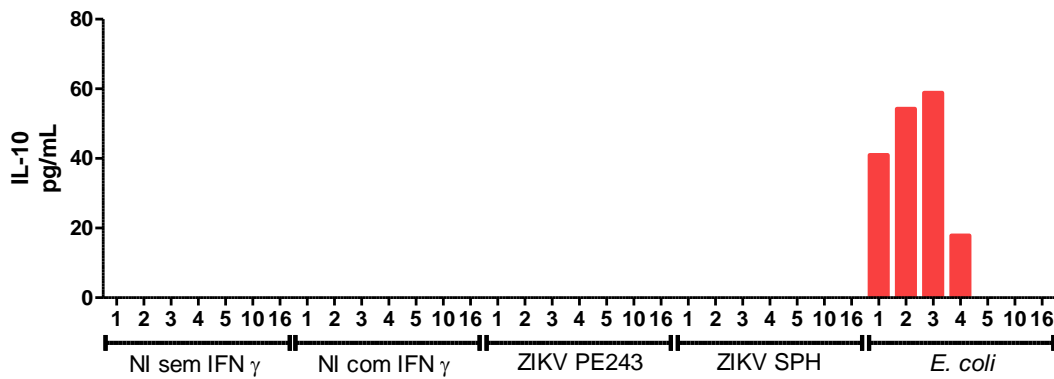


Figura 28: Níveis de IL-10 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado com ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de IL-10 produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences).

5.3.5.5 Cinética da produção de MCP-1

a. Cinética da produção de MCP-1 em macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Os dois vírus estimularam a produção de MCP-1 nos macrófagos infectados com m.o.i. 1 (Figura 29 A), sendo que do 1º ao 5º d.p.i. a produção foi semelhante. E, no 10º e 16º d.p.i. esta produção aumentou, em comparação aos outros dias após a infecção para os dois vírus. Porém, nestes dias, os macrófagos infectados com genótipo I produziram mais MCP-1 em relação aos macrófagos infectados com genótipo III.

Já os macrófagos infectados com m.o.i. 10 (Figura 29 B) produziram MCP-1 de modo semelhante, quando infectados com ambos os genótipos, nos dois dias pesquisados. E ainda, ocorreu diferença na produção de MCP-1 entre os dias após a infecção, sendo que no 10º d.p.i. a produção desta citocina foi maior em comparação ao 2º d.p.i.. Os macrófagos infectados com m.o.i. 10 também produziram mais MCP-1 em comparação aos macrófagos infectados com m.o.i. 1, o que ocorreu para os dois genótipos.

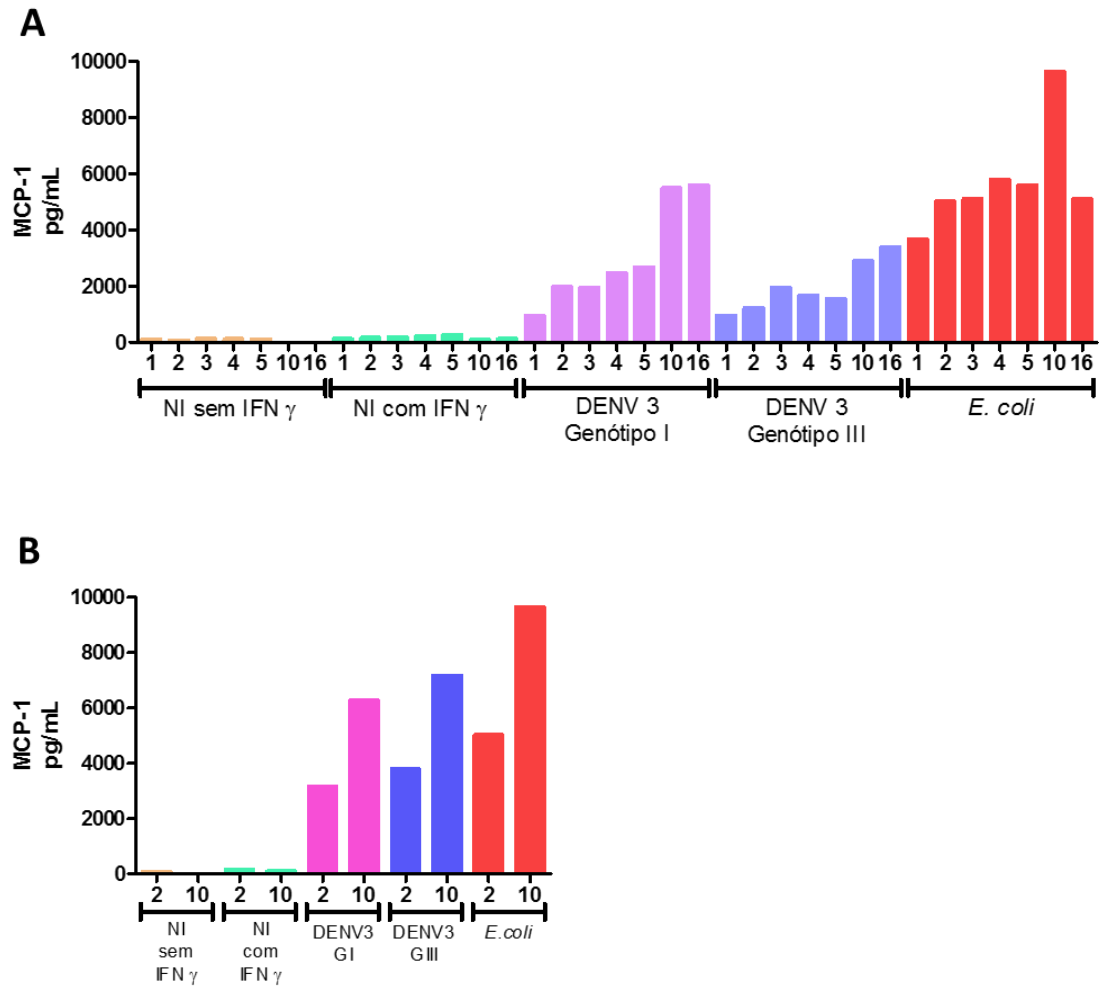


Figura 29: Níveis de MCP-1 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por DENV 3 genótipo I e genótipo III. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” ($n = 5$) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com DENV 3 genótipo I (m.o.i. 1 e 10), um grupo infectado com DENV 3 genótipo III (m.o.i. 1 e 10) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de MCP-1 produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences). (A) Infecção com m.o.i. 1 e coleta dos sobrenadantes com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 d.p.i.. (B) Infecção com m.o.i. 10 e coleta dos sobrenadantes com 2 e 10 d.p.i.. NI: não infectado; DENV 3 GI: DENV 3 genótipo I; DENV 3 GIII: DENV 3 genótipo III.

b. Cinética da produção de MCP-1 em macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e SPH

Os macrófagos infectados com ZIKV PE243 produziram mais MCP-1 em relação aos macrófagos infectados com ZIKV SPH. E ainda, nestes macrófagos infectados com ZIKV PE243, esta produção aumentou do 1º ao 16º d.p.i., tendo um pico de produção no 16º d.p.i.. Os macrófagos infectados com ZIKV SPH também produziram MCP-1, mas em quantidade inferior aos macrófagos infectados com ZIKV PE243, sendo que a produção aumentou discretamente do 1º ao 16º d.p.i. (Figura 30).

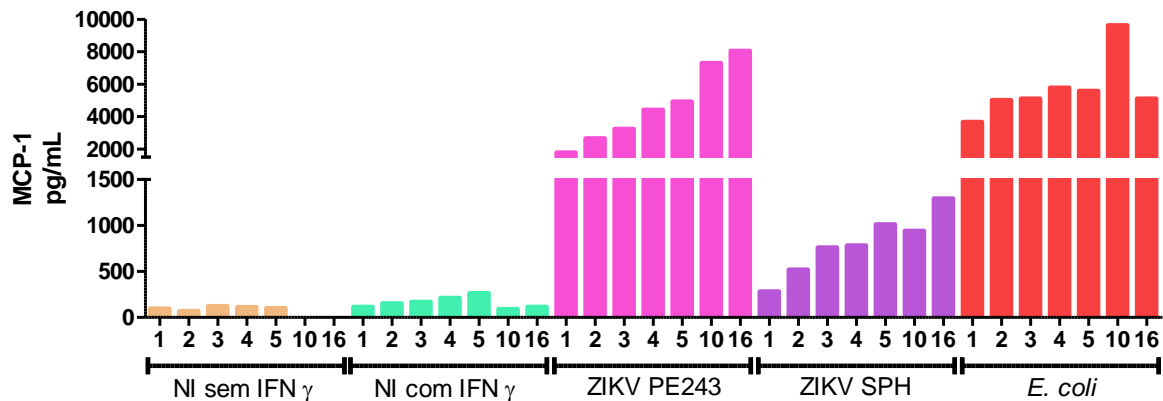


Figura 30: Níveis de MCP-1 produzido por macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT após infecção por ZIKV PE243 e SPH. Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57/BL6 WT foram coletados após estímulo com tioglicolato a 3%. Foi feito um “pool” (n = 5) e 2×10^5 células foram acondicionadas por poço de placa de 96 poços. Foram utilizados dois grupos controle não infectados (NI), um sem IFN γ e outro com estímulo de IFN γ (10 U/ μ L), um grupo infectado com ZIKV PE243 (m.o.i. 1), um grupo infectado ZIKV SPH (m.o.i. 1) e um grupo controle positivo estimulado com *E. coli*. Os sobrenadantes foram coletados com 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 16 dias após a infecção (d.p.i.) e os níveis de MCP-1 produzido foram quantificados por CBA (Mouse Inflammation Kit – BD Biosciences).

5.3.6 Titulação viral dos sobrenadantes de células infectadas com DENV 3 genótipo I, DENV 3 genótipo III, ZIKV PE243 e ZIKV SPH

Os sobrenadantes das células KG-1 e dos macrófagos intraperitoneais foram diluídos seriadamente (10^{-1} a 10^{-7}) e foi feita a titulação em células BHK-21, para determinar a quantidade de vírus ao longo dos dias após a infecção.

Foram acrescentadas as diluições 10^{-3} a 10^{-7} nas células BHK-21, dos sobrenadantes de células KG-1 diluídos. Quanto aos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais, foram acrescentadas às células BHK-1 as diluições 10^{-3} a 10^{-7} , dos sobrenadantes do 1º e 2º d.p.i.. Enquanto que os sobrenadantes do 3º e 5º d.p.i., foram acrescentados nas diluições 10^{-2} a 10^{-6} . E, foram acrescentadas as diluições 10^{-1} a 10^{-5} dos sobrenadantes coletados no 7º e 10º d.p.i.. Como controle foi utilizado um poço com células não infectadas em cada placa. Após adsorção de 1h., foi adicionado meio DMEM contendo 1% de carboximetil celulose (CMC) e 2% de SFB, as placas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, por 10 dias, para os sobrenadantes das células KG-1 infectadas com m.o.i. 1, e, por 7 dias, para os sobrenadantes das células KG-1 infectadas com m.o.i. 10 e para os sobrenadantes dos macrófagos intraperitoneais. As células foram fixadas em solução de formaldeído a 3,7% e coradas com solução de cristal violeta a 1%. O título viral foi determinado pela contagem do número de placas de lise (p.f.u./mL), e o resultado foi apresentado em ordem de grandeza (Tabela 10 e 11).

5.3.6.1 Titulação viral dos sobrenadantes de células KG-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III

Nos sobrenadantes de células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo I, foi detectado vírus em quase todos os d.p.i., com exceção do 5º d.p.i. e do 10º d.p.i. das células infectadas com m.o.i. 10. Nas células infectadas com m.o.i. 1, no 1º d.p.i. foi determinado o título na ordem de grandeza de 10^5 p.f.u./mL. Já no 3º d.p.i. o título viral diminuiu para 10^3 p.f.u./mL. No 5º não foi detectado vírus. E, no 10º d.p.i., o título encontrado foi de 10^3 p.f.u./mL. Enquanto que nas células infectadas com m.o.i. 10 foram visualizadas placas de lise somente no 2º d.p.i., e o título viral encontrado foi 10^4 p.f.u./mL.

Nos sobrenadantes de células KG-1 infectadas com DENV 3 genótipo III, não foram visualizadas placas de lise em nenhuma das diluições utilizadas, portanto não foi detectado vírus em nenhum d.p.i., com nenhuma m.o.i. utilizada.

Nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais infectados com m.o.i. 1 foi detectado vírus somente no 1º d.p.i., com o título na ordem de grandeza de 10^4 p.f.u./mL para o genótipo I e de 10^3 p.f.u./mL para o genótipo III. E, nos macrófagos infectados com m.o.i. 10 do genótipo I, só foi detectado vírus no 2º d.p.i., com título de foi 10^4 p.f.u./mL. Não foram visualizadas placas de lise, portanto não foi detectado vírus, em nenhum d.p.i. nos macrófagos infectados com m.o.i. 10 do genótipo III.

Tabela 10: Título viral dos sobrenadantes de células KG-1 e macrófagos intraperitoneais infectados com DENV 3 genótipo I e genótipo III. O título viral foi determinado pela contagem do número de placas de lise (p.f.u./mL), e o resultado foi apresentado em ordem de grandeza. ND: não detectado.

	KG-1		Macrófago peritoneal	
	DENV 3 genótipo I	DENV 3 genótipo III	DENV 3 genótipo I	DENV 3 genótipo III
m.o.i. 1				
1º d.p.i.	10^5	ND	10^4	10^3
3º d.p.i.	10^3	ND	ND	ND
5º d.p.i.	ND	ND	ND	ND
7º d.p.i.	-	-	ND	ND
10º d.p.i.	10^3	ND	ND	ND
m.o.i. 10				
2º d.p.i.	10^4	ND	10^4	ND
10º d.p.i.	ND	ND	ND	ND

5.3.6.2 Titulação viral dos sobrenadantes de células KG-1 e macrófagos intraperitoneais de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 e SPH

Nos sobrenadantes de células KG-1 infectadas com ZIKV PE243, foi detectado vírus no 1º, 3º e 5º d.p.i., com os títulos 10^5 , 10^4 e 10^3 (p.f.u./mL), respectivamente. Só não foram encontradas placas de lise no 10º d.p.i. Nos sobrenadantes das células KG-1 infectadas com ZIKV SPH, foi detectado vírus no 1º e 5º d.p.i., com os títulos 10^4 e 10^3 (p.f.u./mL), respectivamente. Não foi detectado vírus no 3º e 10º d.p.i..

Nos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais, foi detectado o ZIKV PE243 somente no 1º d.p.i., com um título na ordem de grandeza de 10^4 p.f.u./mL. E, nos macrófagos infectados por ZIKV SPH foi detectado vírus no 1º e 2º d.p.i., com os títulos de foi 10^3 e 10^2 p.f.u./mL, respectivamente.

Tabela 11: Título viral dos sobrenadantes de células KG-1 e macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 e SPH. O título viral foi determinado pela contagem do número de placas de lise (p.f.u./mL), e o resultado foi apresentado em ordem de grandeza. ND: não detectado.

	KG-1		Macrófago peritoneal	
	ZIKV PE243	ZIKV SPH	ZIKV PE243	ZIKV SPH
m.o.i. 1				
1º d.p.i.	10^5	10^4	10^4	10^3
3º d.p.i.	10^4	ND	ND	10^2
5º d.p.i.	10^3	10^3	ND	ND
7º d.p.i.	-	-	ND	ND
10º d.p.i.	ND	ND	ND	ND

6 DISCUSSÃO

Quando o mosquito do gênero *Aedes* infectado pelo DENV, se alimenta do sangue de uma pessoa, o vírus é inoculado na derme e epiderme, e alguns vírus podem ser inoculados direto na corrente sanguínea. Na pele, o DENV infecta as células de Langerhans, as células dendríticas e macrófagos, as quais migram para os linfonodos, desencadeando a recrutamento de monócitos e macrófagos, que por sua vez também se tornam alvos do vírus e são infectados. Desta maneira, o número e a variedade de células infectadas aumenta e a infecção pode se tornar disseminada através do sistema linfático, com a infecção de células da linhagem mononuclear, incluindo monócitos, células dendríticas mielóides e macrófagos do fígado e baço (GUZMAN et al., 2016; JOHNSTON; HALLIDAY; KING, 2000; MAROVICH et al., 2001).

As células utilizadas no nosso estudo são monócitos, como a THP-1, e macrófagos, como a KG-1 e os macrófagos intraperitoneais de camundongo, logo, o DENV teoricamente seria capaz de infectá-las e de se multiplicar nas mesmas. Para confirmar isto, e verificar por quanto tempo o vírus permanece viável nas células, foi feita a titulação em células BHK-21 dos sobrenadantes das células KG-1 e dos macrófagos intraperitoneais infectados por DENV. A capacidade do vírus de infectar macrófagos foi confirmada para o DENV 3 genótipo I nas células KG-1 nos dias 1, 3 e 10 após a infecção, nas células infectadas com m.o.i. 1, e no 2º d.p.i. nas células infectadas com m.o.i. 10. Mesmo que o título viral tenha diminuído ao longo dos dias após a infecção, como são parasitas intracelulares obrigatórios, o fato de ter encontrado o vírus até no 10º d.p.i. comprova sua capacidade de infecção e multiplicação nas células KG-1. DENV 3 genótipo I não teve a mesma capacidade de infecção nos macrófagos intraperitoneais de camundongos, sendo detectado somente no 1º d.p.i.. Isto pode ter ocorrido porque os macrófagos intraperitoneais foram capazes de produzir uma resposta imune eficaz, controlando assim a infecção. Já o DENV 3 genótipo III não foi detectado em nenhum d.p.i. nas células KG-1, mesmo quando infectadas com m.o.i. 10. O genótipo III também só foi detectado nos macrófagos intraperitoneais no 1º d.p.i. e, ainda assim, com o título inferior ao título do genótipo I. Resultados anteriores do nosso grupo, mostraram que camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 4×10^3 p.f.u. de DENV 3 genótipo I apresentaram taxa de mortalidade de 100%, enquanto que camundongos infectados com 4×10^3 p.f.u. de DENV 3 genótipo III sobrevivem 100% (DE SOUZA et al., 2013). Sendo assim, pode-se dizer que o genótipo I possui maior capacidade de infecção, tanto *in vivo* como *in vitro*, em comparação com o genótipo III.

O NO é um importante sinal parácrino e autócrino, utilizado por diferentes tipos celulares e produzido por uma variedade de células, por exemplo, macrófagos, células endoteliais vasculares e células de Kupffer. O NO possui várias funções, como a dilatação de vasos sanguíneos, agregação de plaquetas, combater infecções e tumores, mediar a inflamação e a atividade citotóxica de macrófagos. Na quantidade correta, o NO possui ação protetora e regulatória nas células, porém, em altas concentrações, ele tem efeito tóxico. Durante uma infecção viral, o NO possui vários efeitos, podendo afetar o vírus, inibindo a replicação viral ou causando uma mutação no vírus, ou ele pode afetar o hospedeiro, causando danos celulares e patologia. A indução do NO durante a infecção pode ocorrer diretamente pela replicação viral, ou ele pode ser induzido por citocinas, principalmente pelo IFN γ (CHATURVEDI; NAGAR, 2009). Chen e Wang (2002) mostraram que após a infecção por DENV, macrófagos/monócitos humanos do sangue periférico diferenciados secretaram várias citocinas e quimiocinas inatas, como TNF α , IFN α , IL-1 β , IL-8, MIP-1 α , mas não ocorreu a produção de IL-6, IL-15 ou NO (CHATURVEDI; NAGAR, 2009; CHEN; WANG, 2002).

As células THP-1, que são monócitos humanos, não produziram NO em nenhum dos dias após a infecção, com nenhuma m.o.i. utilizada (m.o.i. 1 e 10), quando infectadas com os dois genótipos de DENV. Já as células KG-1, produziram NO somente quando infectadas com m.o.i. 10 dos dois genótipos, e no 10^o d.p.i., mas em uma quantidade muito baixa. Não foi detectada a produção de NO em nenhum d.p.i. na infecção com m.o.i. 1, o que também ocorreu para os dois vírus. As células THP-1 e KG-1 foram capazes de produzir NO quando infectadas com *E.coli*, comprovando que a técnica utilizada para medir NO foi efetiva. Já os macrófagos peritoneais de camundongos foram capazes de produzir NO após a infecção pelos dois genótipos, e essa produção foi maior quando foi feita infecção com m.o.i. 10. Esta produção de NO *in vitro* por macrófagos intraperitoneais pode ter sido importante no controle da infecção, já que, como já mencionado, foi detectado DENV somente no 1^o d.p.i. nos sobrenadantes destes macrófagos, enquanto que a ausência na produção de NO nas células KG-1 pode ter contribuído para uma resposta imune não efetiva, permitindo que o vírus se multiplicasse nestas células. Estes dados corroboram com a literatura, a qual afirma que macrófagos ativados por IFN γ têm papel importante na resolução da infecção viral, em parte pela produção de NO, que recentemente tem sido mostrado inibindo a multiplicação de DENV *in vitro* (CHATURVEDI; NAGAR, 2009; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; TAKHAMPUNYA; PADMANABHAN; UBOL, 2006). Porém, uma superprodução de NO pode levar ao dano nas células endoteliais e os anticorpos de reação cruzada contra células endoteliais induzem a danos celulares de uma

forma dependente de NO (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Uma resposta inflamatória não específica e reações imunológicas do hospedeiro moduladas por NO podem levar à febre hemorrágica da dengue (CHATURVEDI; NAGAR, 2009). Nosso grupo demonstrou que o NO pode ter um papel neuropatológico na infecção por DENV, já que camundongos nocautes para Nos2 (*Nos2*^{-/-}), quando infectados por via intracraniana com 4×10^2 p.f.u. de DENV 3 genótipo I possuem taxa de sobrevivência de 100%, enquanto que os camundongos C57/BL6 selvagens possuem 100% de mortalidade. E ainda, foi demonstrado que o vírus não se multiplica no cérebro dos camundongos (*Nos2*^{-/-}) (DE SOUZA et al., 2013). Portanto, o NO pode tanto auxiliar no controle da infecção como pode ser prejudicial para a resposta imune contra o vírus. Fato é que o NO tem um papel central na patogênese da dengue, agindo na inibição da replicação de DENV, o que resulta na doença mais branda, a febre da dengue, e, quando NO falha em inibir a replicação viral, resulta na doença grave, a febre hemorrágica da dengue (CHATURVEDI; NAGAR, 2009).

Diversos fatores têm sido associados à patogênese da dengue, como os fatores virais e epidemiológicos e a predisposição genética do hospedeiro. O aumento significativo dos níveis de mediadores inflamatórios solúveis, conhecido como a “tempestade de citocinas” (cytokine storm), está presente nas formas mais graves da doença. A produção exacerbada de vários mediadores inflamatórios pode promover a ativação plaquetária e endotelial, resultando em trombocitopenia, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão e choque, como é observado nos casos graves. No entanto, algumas citocinas, como os IFNs, possuem papel protetor importante durante a infecção por DENV (FIALHO et al., 2017). A infecção viral nas células endoteliais não parece ser a principal causa do extravazamento plasmático, ao contrário, tem sido proposto que a produção de vários fatores solúveis pelas células T, monócitos, macrófagos e mastócitos, estão relacionados com o aumento da permeabilidade vascular nas células endoteliais primárias. Estes fatores incluem TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, fator inibitório da migração de macrófagos, HMGB1 e MCP-1. A produção exacerbada de citocinas é observada em pacientes com febre hemorrágica da dengue e com síndrome do choque da dengue, mudando rapidamente ao longo do curso da doença. (GUZMAN; HARRIS, 2015). A imunopatogênese da dengue provavelmente envolve os efeitos das citocinas tanto nas células imunes infectadas como nas células imunes vizinhas, nos hepatócitos e nas células endoteliais (FAGUNDES et al., 2011).

Nosso trabalho demonstrou que as células KG-1 não produziram IFN γ , TNF, IL-6 e IL-10 nos dias pesquisados e com as m.o.i. utilizadas (m.o.i. 1 e 10), quando infectadas com DENV

3 genótipo I e genótipo III. Enquanto que os macrófagos intraperitoneais de camundongos produziram IFN γ , TNF, IL-6, MCP-1 e não produziram IL-10, quando infectados com os dois genótipos.

Existem vários estudos que demonstraram níveis elevados de IFN γ em pacientes infectados com DENV, mas o papel preciso do IFN γ na dengue é um pouco controverso (BOZZA et al., 2008; FAGUNDES et al., 2011). Há estudos que sugerem que os níveis de IFN γ podem estar relacionados com a doença em humanos (BOZZA et al., 2008), mas outros estudos mostraram que o aumento na produção de IFN γ está relacionado com altas taxas de sobrevivências em pacientes com febre hemorrágica da dengue (CHEN et al., 2006; FAGUNDES et al., 2011). Nossos resultados demonstraram que, *in vitro*, o IFN γ é importante para a resposta imune contra o DENV, já que os macrófagos intraperitoneais de camundongos, nos quais foi detectada a produção desta citocina, foram menos susceptíveis à infecção em comparação com as células KG-1, nas quais não foi detectada a produção de IFN γ . E ainda, ocorreu um aumento na produção de IFN γ no 10^o d.p.i. nos macrófagos intraperitoneais infectados com m.o.i. 10 de DENV 3 genótipo I, o que está associado à ausência de detecção do vírus neste mesmo dia.

O TNF é representado por duas proteínas homólogas primariamente derivadas de fagócitos mononucleares (TNF α) e de linfócitos (TNF β). TNF induz atividade antitumoral, interage com células endoteliais para induzir moléculas de adesão, permitindo assim a saída de granulócitos para o local da inflamação, e ainda é um potente ativador de neutrófilos. O TNF pode também induzir o vazamento vascular e é o principal mediador endógeno de choque e sépsis (BORISH; STEINKE, 2003). Na dengue, o TNF α , é a principal citocina implicada na patogênese da febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue, atuando localmente na ativação de macrófagos, sendo que sua liberação sistêmica pode ser responsável pelo aumento da permeabilidade vascular observado na febre hemorrágica da dengue e na síndrome do choque da dengue (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A IL-6 estimula a diferenciação de linfócitos em células plasmáticas maduras, faz a mediação da ativação, crescimento e diferenciação de células T, estimula a produção de proteínas de fase aguda e também faz a mediação de vários efeitos anti-inflamatórios (BORISH; STEINKE, 2003). Nas infecções por DENV, níveis altos de IL-6 estão relacionados com as formas mais graves da dengue (CHEN et al., 2006; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A MCP-1 é uma quimiocina da família C-C, sendo conhecida também como CCL2. Ela é produzida por uma variedade de tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, células da musculatura lisa, astrócitos, monócitos e células da micróglia, os quais são importantes na resposta imune antiviral na circulação periférica e nos tecidos. Ela pode ser produzida tanto constitutivamente quanto após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. MCP-1 é um fator quimiotático potente de monócitos (DESHMANE et al., 2009). Na dengue, elevados níveis de MCP-1 foram encontrados em pacientes na fase febril com sinais de alarme (RATHAKRISHNAN et al., 2012).

Os macrófagos intraperitoneais infectados com DENV produziram TNF, IL-6 e MCP-1, sendo que o genótipo I estimulou mais a produção destas citocinas e da quimiocina MCP-1, em relação aos macrófagos intraperitoneais infectados com o genótipo III. IL-6 e TNF são encontradas em níveis elevados em pacientes com dengue grave, e MCP-1 é encontrada em pacientes com sinais de alarme, o que pode ser relacionado com a neurovirulência de DENV 3 genótipo I, o qual foi isolado do soro de um paciente que faleceu devido à infecção grave por este vírus.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória envolvida no circuito de feedback que regula negativamente a resposta inflamatória (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Ela é produzida por vários tipos de células, incluindo linfócitos Th1 e Th2, células T citotóxicas, linfócitos B, mastócitos e células fagocitárias mononucleares. Esta citocina é responsável por inibir a produção de IFN γ e IL-2 pelos linfócitos Th1, de IL-4 e IL-5 pelos linfócitos Th2, de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α pelos fagócitos mononucleares e de IFN γ e TNF α pelas células NK (BORISH; STEINKE, 2003). IL-10 foi encontrada em níveis elevados em alguns estudos, mas não em todos, em pacientes com febre hemorrágica da dengue (CHEN et al., 2006, 2005; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; GREEN et al., 1999; PÉREZ et al., 2004). No nosso trabalho, não foi detectada a produção de IL-10 nos macrófagos intraperitoneais de camundongos infectados com DENV, mas a produção de IL-10 foi estimulada pela infecção com *E. coli*, provando que nossa técnica de medida da IL-10 foi eficiente nestas células e que nenhum dos genótipos utilizados de DENV estimulam a produção desta citocina.

O TLR2, é um receptor de reconhecimento padrão (PRR), que reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Ele é capaz de reconhecer inúmeros ligantes, como peptídeoglicanos, lipoproteínas de bactérias, um fator solúvel de fenol de *Staphylococcus epidermidis*, o lipídio glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Trypanosoma cruzi* e zymosan, um

componente da parede celular de leveduras (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). A proteína NS1 é inicialmente expressa em associação com o retículo endoplasmático e durante o ciclo de replicação viral, esta proteína é modificada e se associa à membrana, sendo assim expressa na superfície das células infectadas. Um subconjunto da proteína NS1 adquire GPI da célula hospedeira, utilizando a via de ligação de GPI das células. Esta NS1 ancorada por GPI é então transportada para a membrana celular (GUZMAN et al., 2016; JACOBS et al., 2000). Como já foi dito, o TLR é capaz de reconhecer GPI e, portanto, reconheceria as células infectadas por DENV que expressam em sua membrana a forma da proteína NS1 ancorada por GPI. Nosso trabalho demonstrou que o TLR 2 reconhece os dois genótipos de DENV, sendo que o genótipo I causou maior ativação de TLR em comparação com o genótipo III. Já o TLR 4, que reconhece principalmente LPS, não foi capaz de reconhecer nenhum dos vírus.

Quanto ao ZIKV, sabe-se que pode infectar vários tipos celulares de diferentes tecidos e espécies. Por exemplo, ele é capaz de infectar e se multiplicar nas células do intestino e das glândulas salivares de vários mosquitos do gênero *Aedes* (LI et al., 2012; SAIZ, 2016; WONG et al., 2013) e também *in vitro* nas células de mosquitos C6/36 (HAMEL et al., 2015). O ZIKV também é capaz de se multiplicar em várias células de mamíferos. Experimentos em camundongos demonstraram que o vírus multiplica principalmente nas células do cérebro, incluindo neurônios e astrócitos (HADDOW, 1965; SAIZ, 2016). *In vitro*, o ZIKV pode se multiplicar em culturas de linhagens de células de macaco, como LLC-MK2 e Vero, induzindo efeito citopático (HILARY J. WAY, 1976; SAIZ, 2016). E ainda, em um trabalho publicado recentemente, foi demonstrado que o ZIKV pode se multiplicar em células humanas da pele e em células dendríticas imaturas (HAMEL et al., 2015; SAIZ, 2016). Por sua capacidade de infecção e de multiplicação em diferentes tipos celulares e também, por ser um vírus relacionado ao DENV, era esperado que o ZIKV infectasse e se multiplicasse nas células com as quais trabalhamos, assim como o DENV. Esta capacidade de infecção e multiplicação foi confirmada nas células KG-1, pelos dois ZIKV utilizados. O ZIKV PE243 foi detectado no 1º, 3º e 5º d.p.i., e o ZIKV SPH foi detectado no 1º e 5º d.p.i.. Mesmo que o título tenha diminuído ao longo dos dias após a infecção, como são parasitas intracelulares obrigatórios, a detecção do vírus até o 5º d.p.i. demonstrou que ele foi capaz de infectar e se multiplicar nas células KG-1. Esta capacidade de infecção e multiplicação foi diferente nos macrófagos intraperitoneais de camundongos. Nestes, o ZIKV PE243 foi detectado somente no 1º d.p.i. e o ZIKV SPH foi detectado somente no 1º e 3º d.p.i., ambos com um título mais baixo em comparação com os mesmos dias após a infecção das células KG-1. A hipótese apresentada para a infecção por

DENV, na qual os macrófagos intraperitoneais de camundongos foram capazes de produzir uma resposta imune eficaz contra o vírus, controlando a infecção, também pode ser utilizada para explicar o resultado encontrado na infecção por ZIKV.

Quanto à produção de NO, as células THP-1 e KG-1 não produziram NO após a infecção pelos dois vírus, em nenhum dos dias pesquisados e com a m.o.i. utilizada (m.o.i. 1), mas estas células produziram NO quando infectadas com *E. coli*, provando que a técnica utilizada para detecção de NO funcionou e que realmente o ZIKV não estimulou a produção de NO. Já os macrófagos intraperitoneais de camundongos produziram altos níveis de NO após a infecção pelo ZIKV PE243. Não foi detectada a produção de NO nas células infectadas pelo ZIKV SPH. Não foram encontrados dados na literatura que relacionam a produção de NO durante a infecção por ZIKV. Nossos resultados demonstraram que foi detectado ZIKV PE243 e SPH até o 5º d.p.i. nas células KG-1, nas quais não foi detectado a produção de NO, e ZIKV SPH até o 2º d.p.i. nos macrófagos intraperitoneais, nos quais o ZIKV SPH não estimulou a produção de NO. Assim, pode-se dizer que o NO é importante para o controle da infecção por ZIKV. O ZIKV PE243 estimulou a produção de NO nos macrófagos intraperitoneais de camundongos e foi detectado somente no 1º d.p.i., assim, pode-se inferir que o óxido nítrico produzido pelos macrófagos intraperitoneais de camundongos auxiliou no controle da infecção por ZIKV PE243.

Em um estudo recente, foram analisadas as citocinas e quimiocinas presentes no soro de pacientes infectados com ZIKV em fase aguda e em fase de recuperação. As citocinas IL-6 e IL-10 foram encontradas em concentrações elevadas tanto na fase aguda como na fase de recuperação em comparação com pacientes saudáveis. Os níveis de IFN γ mostraram uma tendência crescente na fase aguda e de recuperação, enquanto que as concentrações de TNF α mostraram um aumento médio durante a fase aguda. Não foi detectada nenhuma alteração na produção de MCP-1 durante a fase aguda ou de recuperação (TAPPE et al., 2016). Em outro estudo, foi demonstrado que animais nocautes para receptores de interferon α/β (Ifnar1^{-/-}) e triplo nocautes para fatores de transcrição envolvidos na indução de IFN (Irf3^{-/-}/Irf5^{-/-}/Irf7^{-/-}) desenvolvem doença neurológica e não resistem à infecção por ZIKV (LAZEAR et al., 2016; XIE; SHAN; SHI, 2016). Outro estudo feito com fibroblastos humanos demonstrou que o ZIKV é altamente sensível à atividade antiviral dos IFN α , β e γ (HAMEL et al., 2015). No nosso trabalho, só foi detectada produção da citocina IL-6 nas células KG-1 infectadas com ZIKV SPH, mas não foi detectada nas células infectadas com ZIKV PE243. IFN γ , TNF e IL-10 não foram detectados nas infecções tanto pelo ZIKV PE243 quanto para ZIKV SPH. Já nos

macrófagos peritoneais de camundongos, não foi detectada a produção de IFN γ . Quanto ao TNF, ocorreu maior produção desta citocina nos macrófagos intraperitoneais infectados por ZIKV PE243 em comparação com os macrófagos infectados com ZIKV SPH. Já a citocina IL-6 foi produzida somente em alguns dias após a infecção nos macrófagos infectados por ZIKV PE243, e, somente no 5º dia e em baixas quantidades, nos macrófagos infectados com ZIKV SPH. Também foi maior a produção da quimiocina MCP-1 nos macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV PE243 em comparação com os macrófagos infectados com ZIKV SPH. Como ocorreu a produção de TNF e IL-6 nos macrófagos intraperitoneais infectados com as duas amostras de ZIKV, e não foi detectada a produção destas citocinas nas células KG-1 infectadas com as mesmas amostras, com exceção de IL-6, a qual foi produzida na infecção por ZIKV SPH, pode-se dizer que estas citocinas foram importantes no combate à infecção por ZIKV, já que as células KG-1 apresentaram maior susceptibilidade à multiplicação dos dois vírus. Não foi detectada a produção de IL-10 nos macrófagos infectados com nenhuma das amostras de ZIKV utilizadas.

Somente ZIKV PE243 foi capaz de ativar TLR2 enquanto que o ZIKV SPH não ativou TLR2 mesmo quando as células foram infectadas com m.o.i. 10. No caso do DENV, como já foi falado, sabe-se que a proteína NS1 pode ser apresentada em uma forma ancorada por uma GPI na membrana celular, e o GPI é um ligante de TLR2. Não foi encontrado nenhum dado na literatura que comprove que a proteína NS1 de ZIKV pode estar relacionada com glicolípido GPI. Nenhum ZIKV ativou TLR4.

É importante notar que, durante este trabalho, as duas amostras utilizadas de ZIKV apresentaram significativas diferenças na resposta imune. E ainda, em um sequenciamento realizado por outro grupo de pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou, foi comprovado que existe diferença de três aminoácidos nas sequências do genoma viral. Portanto, pode-se concluir que são isolados bastante distintos e produzem uma resposta imune completamente diferente, o que é um dado preocupante, já que a reatividade cruzada de anticorpos (ADE) é um fenômeno característico de muitos flavivírus, como o DENV, e está associado com a forma mais grave da doença. Inclusive, dados da literatura demonstram que é provável que ocorra a reatividade cruzada de anticorpos entre ZIKV e outras espécies de flavivírus, incluindo DENV (PAUL et al., 2016; STETTLER et al., 2016). Se este fenômeno é comum entre ZIKV e outros flavivírus, pode ser ainda mais comum entre os próprios ZIKVs.

Estas análises são importantes, pois pudemos observar que as diferentes amostras de ZIKV podem infectar de modo diferente células distintas e provocar respostas imunes também diferentes nestas células. Estes dados podem indicar que há amostras diferentes de ZIKV, que podem ter virulências distintas e assim, provocar infecções de diferente gravidade.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste trabalho, é possível concluir que as células KG-1, que são macrófagos humanos, foram mais susceptíveis à infecção e multiplicação de DENV 3 genótipo I em comparação com os macrófagos intraperitoneais de camundongos. E ainda, DENV 3 genótipo I demonstrou maior capacidade de infecção em comparação com o genótipo III nas células KG-1. A baixa multiplicação viral nos macrófagos intraperitoneais de camundongo permite sugerir que estes foram capazes de produzir uma resposta imune inata eficaz contra a infecção por DENV.

No nosso modelo de estudo, foi demonstrado que o NO e o $\text{IFN}\gamma$ são importantes no controle da infecção por DENV 3 e que a produção elevada das citocinas TNF e IL-6 e da quimiocina MCP-1 está relacionada com a infecção pelo genótipo de DENV 3 neurovirulento (genótipo I). Também foi demonstrado que DENV 3 ativa TLR2, e que esta ativação também é maior no genótipo neurovirulento. Portanto, de maneira geral, a resposta imune desencadeada pelo genótipo neurovirulento é diferente em comparação com o genótipo não neurovirulento.

Quanto aos resultados referentes a ZIKV, foi demonstrado que as células KG-1 são mais susceptíveis à infecção e multiplicação de ZIKV em comparação com os macrófagos intraperitoneais de camundongos. Os macrófagos intraperitoneais infectados com ZIKV, como os macrófagos infectados por DENV, também tiveram baixa taxa de multiplicação viral, sendo assim possível sugerir que isto ocorreu devido à capacidade de produzirem uma resposta imune eficaz contra a infecção por ZIKV.

E ainda, a partir dos resultados apresentados, podemos concluir que as duas amostras de ZIKV utilizadas desencadeiam respostas imunes diferentes, sendo que a amostra ZIKV PE243 desencadeou uma resposta imune mais forte, com produção de NO, maior produção das citocinas e ativação de TLR2. Enquanto que a resposta imune desencadeada por ZIKV SPH foi mais branda, sem produção de NO, com menor produção de citocinas e sem a ativação de TLR2.

REFERÊNCIAS

- ALERA, M. T. et al. **Zika virus infection, philippines, 2012.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 4, p. 722–724, 2015.
- ALVES, M. J. et al. **Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira Island, Portugal, October 2012.** *Eurosurveillance*, v. 18, n. 6, p. 3–6, 2013.
- AMARAL, D. C. G. et al. **Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice.** *Journal of neuroinflammation*, v. 8, n. 1, p. 23, 2011.
- BESNARD, M. et al. **Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014.** *Eurosurveillance*, v. 19, n. 13, p. 8–11, 2014.
- BESNARD, M. et al. **Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia.** *Eurosurveillance*, v. 21, n. 13, 2016.
- BHATT, S. et al. **The global distribution and burden of dengue.** *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. **Cytokines and chemokines.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, n. 2, p. 460–475, 2003.
- BOZZA, F. A et al. **Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity.** *BMC infectious diseases*, v. 8, n. 1, p. 86, 2008.
- BRASIL, P.; NIELSEN-SAINES, K. **More pieces to the microcephaly-Zika virus puzzle in Brazil.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 12, p. 1307–1309, 2016.
- BUATHONG, R. et al. **Detection of zika virus infection in Thailand, 2012-2014.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 2, p. 380–383, 2015.
- BUTLER, D. **Zika-linked birth defects seen in Colombia.** *Nature*, v. 531, n. 7593, p. 153, 2016.
- CALVET, G. et al. **Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.
- CHAMBERS, T. J. et al. **Flavivirus genome organization, expression, and replication.** *Annual review of microbiology*, v. 44, p. 649–688, 1990.
- CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. **Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: Necessity or nuisance?** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 9–24, 2009.

- CHEN, L.-C. et al. **Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 74, n. 1, p. 142–147, 2006.
- CHEN, R. F. et al. **Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 43–50, 2005.
- CHEN, Y.; WANG, S. **Activation of Terminally Differentiated Human Monocytes / Macrophages by Dengue Virus : Productive Infection , Hierarchical Production of Innate Cytokines and Chemokines , and the Synergistic Effect of Lipopolysaccharide Activation of Terminally Different.** *Journal of Virology*, v. 76, n. 19, p. 9877–9887, 2002.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.** *Journal of virology*, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, 2006.
- CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. **Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells.** *FEMS Microbiology Reviews*, 2015.
- CUGOLA, F. R. et al. **The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models.** *Nature*, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.
- DE MIRANDA, A. S. et al. **Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice.** *Behavioural Brain Research*, v. 230, n. 1, p. 237–242, 2012.
- DE PAULA FREITAS, B. et al. **Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital.** *JAMA Ophthalmology*, v. 134, n. 5, p. 529–35, 2016.
- DE SOUZA, K. P. R. et al. **Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement.** *Virology journal*, v. 10, p. 267, 2013.
- DELUDE, R. L. et al. **Construction of a lipopolysaccharide reporter cell line and its use in identifying mutants defective in endotoxin, but not TNF-alpha, signal transduction.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 161, n. 6, p. 3001–9, 1998.
- DESHMANE, S. L. et al. **Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.
- DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. **Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control.** *Cell*, v. 162, n. 3, p. 488–492, 2015.
- DICK, G. W. A. **Zika Virus (I). Isolations and serological specificity.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DRIGGERS, R. W. et al. **Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities.** *The New England journal of medicine*, p. NEJMoa1601824, 2016.

- DUTRA, H. L. C. et al. **Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes.** *Cell Host and Microbe*, v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016.
- ENFISSI, A. et al. **Zika virus genome from the Americas.** *The Lancet*, v. 387, n. 10015, p. 227–228, 2016.
- FAGUNDES, C. T. et al. **IFN-gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 12, 2011.
- FARIA, N. R. et al. **Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 352, n. 6283, p. aaf5036, 2016.
- FERREIRA, G. P. et al. **Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection.** *Microbes and Infection*, v. 12, n. 7, p. 546–554, 2010.
- FIALHO, L. G. et al. **Induced nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) detection in circulating monocyte subsets from Brazilian patients with dengue-4.** *Virology Reports*, 2017.
- FOY, B. D. et al. **Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.
- GOULD, E. A.; SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses.** v. 371, 2008.
- GOURINAT, A. C. et al. **Detection of zika virus in urine.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.
- GREEN, A. M. et al. **Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses.** *Journal of Molecular Biology*, v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 2014.
- GREEN, A. M. et al. **Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses.** v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 2015.
- GREEN, S. et al. **Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate With Disease Severity.** *J Med Virol*, v. 334, n. April, p. 329–334, 1999.
- GUZMAN, M. G. et al. **Dengue infection.** *Nature reviews. Disease primers*, v. 2, p. 16055, 2016.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. **Dengue.** *The Lancet*, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.
- HADDOW, A. D. et al. **Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 2, 2012.
- HADDOW, A J. **From the East African Virus Research Institute , Entebbe , Uganda.** v. 59, n. 4, p. 436–440, 1965.
- HALSTEAD, S. B. **The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research.** *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*, v. 45, n. 14, p. 292–298, 1992.

HAMEL, R. et al. **Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells.** *J Virol*, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HAMEL, R. et al. **Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions.** *Microbes and Infection*, v. 18, n. 7–8, p. 441–449, 2016.

HEANG, V. et al. **Zika virus infection, Cambodia, 2010.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p. 349–351, 2012.

HILARY J. WAY, E. T. W. B. A. G. S. P. **Comparative Studies of some African Arboviruses in Cell Culture and in Mice.** *JV0300010123.pdf*, 1976.

HILLS, S. L. **Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission—continental United States, 2016.** *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 65, n. 8, 2016.

JACOBS, M. G. et al. **Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction.** *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 14, n. 11, p. 1603–1610, 2000.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. **I Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 197–216, 2002.

JENSENIUS, M. et al. **Acute and potentially life-threatening tropical diseases in western travelers - A GeoSentinel multicenter study, 1996-2011.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 2, p. 397–404, 2013.

JOHNSTON, L. J.; HALLIDAY, G. M.; KING, N. J. C. **Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 114, n. 3, p. 560–568, 2000.

KLEBER GIOVANNI, LUZ; GLAUCO IGOR VIANA DOS, SANTOS; RENATA DE MAGALHÃES, V.-S. **MORE AT: Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro — Preliminary Report.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6736, n. 16, p. 2016, 2016.

KOOL, J. L. et al. **Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia** *NEJM* 2008. p. 2536–2543, 2009.

KOSCHINSKI, A. et al. **The membrane proteins of flaviviruses form ion-permeable pores in the target membrane after fusion: Identification of the pores and analysis of their possible role in virus infection.** *Journal of General Virology*, v. 84, n. 7, p. 1711–1721, 2003.

KRAEMER, M. U. G. et al. **The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*.** *eLife*, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 2015.

KUHN, R. J. et al. **Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion.** *Cell*, v. 108, n. 5, p. 717–725, 2002.

- KUNO, G. et al. **Phylogeny of the genus Flavivirus.** Journal of virology, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.
- KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. **Case report: Zika virus infection acquired during brief travel to indonesia.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 89, n. 3, p. 516–517, 2013.
- LAROCCA, R. A. et al. **Vaccine protection against Zika virus from Brazil.** Nature, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 2016.
- LAZEAR, H. M. et al. **A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis.** Cell Host and Microbe, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.
- LI, C. et al. Correction: **Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice.** Cell Stem Cell, v. 19, n. 5, p. 672, 2016.
- LI, M. I. et al. **Oral Susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika Virus.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 8, 2012.
- LIMKITTIKUL, K.; BRETT, J.; L'AZOU, M. **Epidemiological Trends of Dengue Disease in Thailand (2000–2011): A Systematic Literature Review.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 8, n. 11, 2014.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. **Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.** Fields Virology, p. 1101–1151, 2007.
- MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. **Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication.** Virology, v. 220, n. 1, p. 232–240, 1996.
- MACNAMARA, F. N. **Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MAROVICH, M. et al. **Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection.** APC. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, v. 6, n. 3, p. 219–224, 2001.
- MARRS, C. et al. **Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations.** American Journal of Perinatology, v. 1, n. 212, p. 625–639, 2016.
- MESSINA, J. P. et al. **Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history.** Trends in Microbiology, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.
- MLAKAR, J. . J. et al. **Zika Virus Associated with Microcephaly.** New England Journal of Medicine, v. 374, n. 10, p. 951–8, 2016.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** Nature reviews. Microbiology, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. **The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker.** *Antiviral research*, v. 98, n. 2, p. 192–208, 2013.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. **Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses.** *Journal of virology*, v. 79, n. 13, p. 8004–8013, 2005.

MUNOZ-JORDAN, J. L.; SANTIAGO, G. A. **Inconclusive Reverse Transcription-PCR Assay Comparison for Dengue Virus Detection and Serotyping.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 1800–1800, 2014.

MUSSO, D. et al. **Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014.** *Eurosurveillance*, v. 19, n. 14, p. 14–16, 2014.

MUSSO, D. et al. **Detection of Zika virus in saliva.** *Journal of Clinical Virology*, v. 68, p. 53–55, 2015a.

MUSSO, D. et al. **Potential sexual transmission of Zika virus.** *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015b.

NEAL, J. W. **Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS?** *The Journal of infection*, v. 69, n. 3, p. 203–15, 2014.

OEHLER, E. et al. **Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013.** *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. **Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg?** *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.

OLSON, J. G. et al. **Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.

OOI, E.-E.; GUBLER, D. J. **Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention.** *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, v. 25 Suppl 1, p. S115–S124, 2009.

PAUL, L. M. et al. **Dengue Virus Antibodies Enhance Zika Virus Infection.** *bioRxiv*, v. 5, n. 12, p. 50112, 2016.

PÉREZ, A. B. et al. **IL-10 Levels in Dengue Patients: Some Findings from the Exceptional Epidemiological Conditions in Cuba.** *Journal of Medical Virology*, v. 73, n. 2, p. 230–234, 2004.

- RATHAKRISHNAN, A. et al. **Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness.** PLoS ONE, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2012.
- ROBY, J. A. et al. **Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins.** Journal of General Virology, v. 96, n. 7, p. 1551–1569, 2015.
- ROEHRIG, J. T. **Antigenic Structure of Flavivirus Proteins.** Advances in Virus Research, v. 59, p. 141–175, 2003.
- ROSSI, S. L. et al. **Characterization of a novel murine model to study zika virus.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 6, p. 1362–1369, 2016.
- SAIZ, J.-C. **Zika virus: The latest newcomer.** Frontiers in Microbiology, v. 7, n. APR, p. 1–19, 2016.
- SAN MARTÍN, J. L. et al. **The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 82, n. 1, p. 128–135, 2010.
- SAVIDIS, G. et al. **Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics.** Cell Reports, v. 16, n. 1, p. 232–246, 2016.
- SCHMID, M. A.; DIAMOND, M. S.; HARRIS, E. **Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity.** Frontiers in immunology, v. 5, n. December, p. 647, 2014.
- SCREATON, G. et al. **New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection.** Nature Publishing Group, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA. Boletim Epidemiológico. v. 48, n. Tabela 2, p. 1–9, 2017a.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA. Boletim Epidemiológico. v. 48, n. Tabela 2, p. 1–11, 2017b.
- SELIGMAN, S. J.; BUCHER, D. J. **The importance of being outer: Consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein.** ETrends in Microbiology, 2003.
- SHARP, T. M. et al. **A New Look at an Old Disease: Recent Insights into the Global Epidemiology of Dengue.** Current Epidemiology Reports, v. 4, n. 1, p. 11–21, 2017.
- SHEPARD, D. S. et al. **Economic impact of dengue illness in the Americas.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.
- SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A. **Economic and Disease Burden of Dengue in Southeast Asia.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 2, 2013.
- SIMMONDS, P. et al. **ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae.** Journal of General Virology, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.
- SINGH, M. V. et al. **Preventive and therapeutic challenges in combating Zika virus infection: are we getting any closer?** Journal of NeuroVirology, 2017.

- STANDISH, K. et al. **High dengue case capture rate in four years of a cohort study in Nicaragua compared to national surveillance data.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 3, p. 2–6, 2010.
- STETTLER, K. et al. **Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection.** Science, v. 8505, n. July, p. 1–9, 2016.
- TAKHAMPUNYA, R.; PADMANABHAN, R.; UBOL, S. **Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication.** Journal of General Virology, v. 87, n. 10, p. 3003–3011, 2006.
- TAPPE, D. et al. **Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase.** Medical Microbiology and Immunology, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.
- VENTURA, C. V. et al. **Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly.** The Lancet, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016.
- VON GIESEN, H.-J. **Neurotropic Viral Infections.** [s.l: s.n.]. v. 66
- WAHALA, W. M. P. B.; DE SILVA, A. M. **The human antibody response to dengue virus infection.** Viruses, v. 3, n. 12, p. 2374–2395, 2011.
- WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control.** Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, p. 147, 2009a.
- WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control.** Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, p. x, 147, 2009b.
- WHO. **Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020.** World Health Organization, p. 43, 2012.
- WHO. **Zika virus outbreaks in the Americas. Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations,** v. 90, n. 45, p. 609–610, 2015.
- WHO. **Weekly Epidemiological Report. WHO,** v. 30, n. 30, p. 349–364, 2016.
- WHO. **WHO Situation report Zika virus.** n. FEBRUARY, p. 1–6, 2017.
- WONG, P. S. J. et al. **Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 8, p. 1–5, 2013.
- XIE, X. et al. **Two Distinct Sets of NS2A Molecules Are Responsible for Dengue Virus RNA Synthesis and Virion Assembly.** Journal of virology, v. 89, n. 2, p. 1298–313, 2015.
- XIE, X.; SHAN, C.; SHI, P.-Y. **Restriction of Zika Virus by Host Innate Immunity.** Cell Host & Microbe, v. 19, n. 5, p. 566–567, 2016.
- YU, I. et al. **Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation.** Science, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 2008.

ZAMMARCHI, L. et al. **Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications.** *Journal of Clinical Virology*, v. 63, p. 32–35, 2015.

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

ZHANG, Y. et al. **Structures of immature flavivirus particles.** *EMBO Journal*, v. 22, n. 11, p. 2604–2613, 2003.

ZHOU, K. et al. **Molecular and cellular insights into Zika virus-related neuropathies.** *Journal of NeuroVirology*, v. 2016, p. 1–6, 2017.

ANEXOS

Anexo I - Licença LW-7/16



LICENÇA

LW-7/16

Certificamos que o protocolo (P-7/15-4), intitulado "Resposta imune a dengue virus em modelo murino", sob a responsabilidade de MARCO ANTONIO DA SILVA CAMPOS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 29/02/2020 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 88 Machos de C57BL/6, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Mus musculus

- 88 Machos de 129 TRIF, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Mus musculus

- 88 Machos de MYD-J-, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Mus musculus

- 88 Machos de TLR2/TLR9 KO, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de 129 Svl/Ev, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

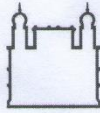
Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
29/02/16

Anexo II - Licença LW-33/16



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice-presidência de Pesquisa e
 Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-33/16

Certificamos que o protocolo (P-15/16-5), intitulado "Estudo da resposta imune inata contra Zika virus em modelo murino", sob a responsabilidade de MARCO ANTONIO DA SILVA CAMPOS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 28/11/2020 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 88 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de 129 Sv/Ev, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de 129 TRIF, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de MYD-/-, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de TLR2/TLR9 KO, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de B6. 129 P2 - Nos2, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000.

Rio de Janeiro, 28 de novembro de 2016

Octavio Augusto França Presgrave
 Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
 Coordenador
 CEUA/FIOCRUZ
 SIAPE 04626550
 28/11/2016

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
 Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

Anexo III - Participação em Artigos Científicos

RESEARCH

Open Access

Dendritic cells, macrophages, NK and CD8⁺ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B



Natália Lucinda¹, Maria Marta Figueiredo¹, Natália Lima Pessoa¹, Beatriz Senra Álvares da Silva Santos¹, Graciela Kurrath Lima², Arthur Molinari Freitas¹, Alexandre Magalhães Vieira Machado¹, Erna Geessien Kroon³, Lis Ribeiro do Valle Antonelli⁴ and Marco Antônio Campos^{1*}

Abstract

Background: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) cause not only mild symptoms but also blindness and encephalitis. It was previously shown that the immune response against HSV-1 occurs mainly in the trigeminal ganglia (TG) and that Toll-like receptors 2 and 9 (TLR2/9) are important in mediating this response. It was also demonstrated that iNOS (nitric oxide synthase) and interleukin 1 beta (IL-1 β) play an essential role in the defense against HSV-1 infection. Importantly, the present work aimed to identify the primary cells responsible for iNOS and IL-1 β production and search for other important molecules and cells that might or might not depend on TLR2/9 receptors to mediate the immune response against HSV-1.

Methods: C57BL/6 (wild type, WT) and TLR2/9^{-/-} mice were infected by the intranasal route with HSV-1 (1 \times 10⁶ p.f.u.). Cells were obtained from the TG and spleen tissues and the profile of immune cells was determined by flow cytometry in infected and mock infected WT and knockout mice. The percentage of cells producing iNOS, IL-1 β , granzyme B and perforin was also determined by flow cytometry. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) was measured by Cytometric Bead Array (CBA) in the TG, spleen and lung. Expression of type I interferons (IFNs), interleukins (IL) 5 and 10, IL-1 β and granzyme B were quantified by real time PCR.

Results: The results indicate that dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages (Mo/M ϕ) were the main sources of IL-1 β and iNOS, respectively, which, together with type I IFNs, were essential for the immune response against HSV-1. Additionally, we showed that granzyme B produced by CD8⁺ T and NK lymphocytes and MCP-1 were also important for this immune response. Moreover, our data indicate that the robust production of MCP-1 and granzyme B is either TLR-independent or down regulated by TLRs and occurs in the TG of TLR2/9^{-/-} infected mice.

Conclusion: Taken together, our data provide strong evidence that the responses mediated by DCs, Mo/M ϕ , NK and CD8⁺ T lymphocytes through IL-1 β , iNOS and granzyme B production, respectively, together with the production of type I IFN early in the infection, are crucial to host defense against HSV-1.

Keywords: Herpes simplex virus 1, Innate immunity, Dendritic cells, Macrophages, CD8⁺ T lymphocytes, TLRs, Murine model, Neuropathogenesis, Encephalitis

* Correspondence: marcosc@cpqrr.fiocruz.br

¹Imunologia de Doenças Virais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190002, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) usually causes mild clinical symptoms such as herpes labialis, but in neonates and immunocompromised individuals, HSV-1 could lead to severe ophthalmic and neurologic lesions, culminating in blindness, encephalitis or even death [1]. HSV-1 establishes a lifelong latent infection in neuronal cells, predominantly in trigeminal ganglia (TG) [2]. The innate immune response is generated mainly through pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), which are capable of recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [3]. Studies have shown that deficiency in some TLRs and their transducers, such as MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) and TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), can result in encephalitis and host death [4–9]. Infectious agent recognition activates TLR-signaling pathways, which culminate in pro-inflammatory cytokine production [3, 10, 11]. Among these cytokines, type I interferons (IFNs) (mainly IFN- α and IFN- β) play an important role in the innate response to HSV-1, since they stimulate the expression of many interferon-stimulated genes. This stimulation results in the production of cytokines, such as interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IFN- γ and some chemokines, that lead to the recruitment of innate immune cells to the local site of infection, ending ultimately in activation of the adaptive response and infection control [12–16]. The main cells responsible for this coordinated immune response against HSV-1 are natural killer (NK), dendritic (DC) and T cells, mainly CD8⁺ lymphocytes [10, 11].

Thus, to study the immune response triggered by this herpesvirus, we used the intranasal model of infection. This route of infection was an alternative to the labial infection since this method caused lesions in the oral epithelium that resulted, ultimately, in cannibalism among the animals. As the TG innervates extensive areas of the face (through branches of the ophthalmic, maxillary and mandibular nerves), including the oral and nasal region [17–19], this model of infection maintain the route of HSV-1 infection and does not cause tissue lesions.

Previous studies from our group showed that the TG, but not the brain, seem to be the local site where an efficient immune response against HSV-1 occurs [6, 8, 9]. We used the HSV-1 strain EK, which was isolated from a human case of recurrent oral herpes with blisters. C57BL/6 intranasally infected with 10^6 pfu of this strain show mild signs of infection (fur loss and snout edema) by the 4th and 5th day after infection. C57BL/6 mice have a mortality rate of only 10% while TLR2/9^{-/-} mice have a 100% mortality rate between the 5th and 8th day after infection with signs of encephalitis (prostration, ruffled fur, hunched posture, and posterior paw paralysis) [6, 8].

Analysis of the kinetics of viral replication as well as of some cytokines expression in the TG of C57BL/6 animals revealed that on the 5th day post infection (5 dpi) there are peaks of virus multiplication and also of some pivotal cytokines expression for an efficient immune response [8]. These peaks are subsequently accompanied by a decrease in viral replication as well as in the levels of cytokines. Additionally, no viral particles were detected in the brains of these animals, showing that they can control the infection in the TG, not developing encephalitis [8]. For this reason in our model of intranasal infection we have chosen the 5th day to study the immune response, since, it seems to be the “key” day to control virus in the TG of C57BL/6 animals in this model. Thus, immune response analyzes in TLR2/9^{-/-} animals were also performed on this day as they beginning to die after the 5th day, which suggests that this day is important for the infection outcome. Moreover, it was demonstrated that the adaptor molecule MyD88 or the TLR2 and TLR9 receptors together are crucial to host survival, since mice deficient in these molecules succumb to HSV-1 infection with encephalitis, whereas wild-type (WT) C57BL/6 mice can control the infection and survive [8, 9]. We have also demonstrated the important role of macrophages (M ϕ) as iNOS producers in host defense against HSV-1 [6].

Here, the present work aimed to further study the immune response against HSV-1 by identifying the organs and cells responsible for producing iNOS, IL-1 β and granzyme B in WT mice, together with the early production of type I IFN, and comparing them to the response in TLR2/9^{-/-} mice to identify which molecules are dependent on TLR2 and TLR9 receptors together and looking for other important organs and molecules in the HSV-1 immune response.

Methods

Vero cells

For virus replication and titration, Vero cells (ATCC) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil) and antibiotics at 5% CO₂ and 37 °C.

Virus replication and purification

Cell culture flasks containing cells at 80% confluence were infected with HSV-1, strain EK [20], which was isolated from a human case of recurrent oral herpes with blisters, at a multiplicity of infection (m.o.i) of 0.1. After virus adsorption for 1 h in DMEM, the cells were maintained for 2 days in DMEM supplemented with 2% FBS. Purification of infectious virus particles was performed by collecting the supernatant of infected Vero cells. The supernatants were precipitated by dripping a saturated

ammonium sulfate solution to yield an ammonium sulfate concentration of 60% in the final volume of the mixture. This step occurred on ice under agitation. The mixture was then centrifuged at $10,415 \times g$ at $4^\circ C$ for 30 min. The precipitate was dissolved in 5 mL of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and centrifuged in a sucrose gradient (36%) in an ultracentrifuge at $36,320 \times g$ at $4^\circ C$ for 2 h. The supernatants were carefully removed and the pellet was dissolved in Tris-HCl 10 mM, pH 8.0.

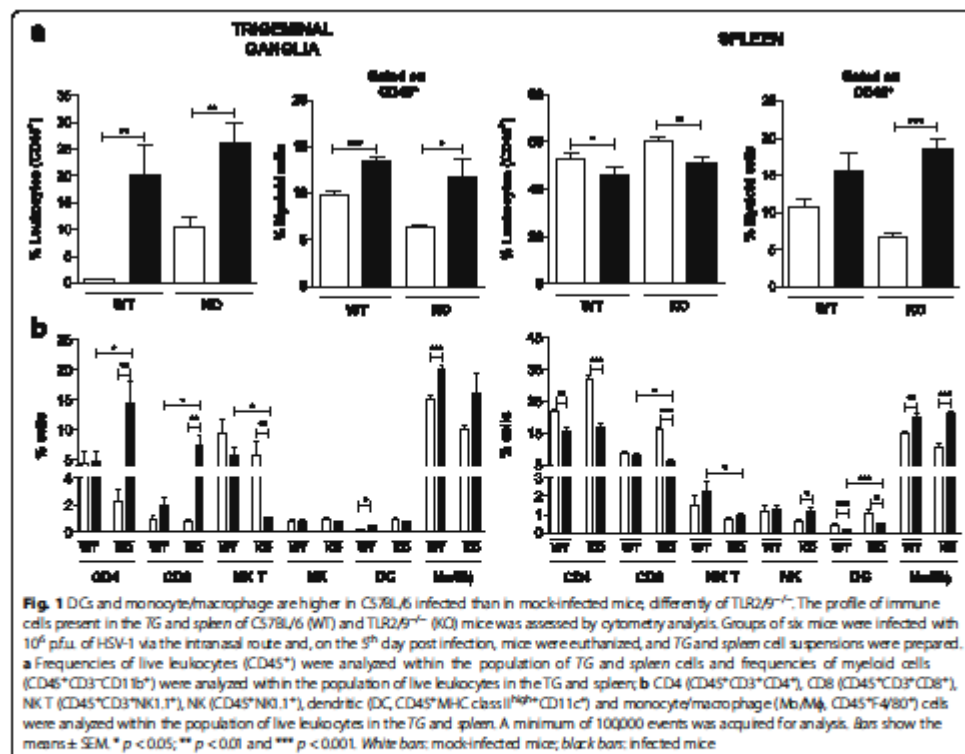
Animals

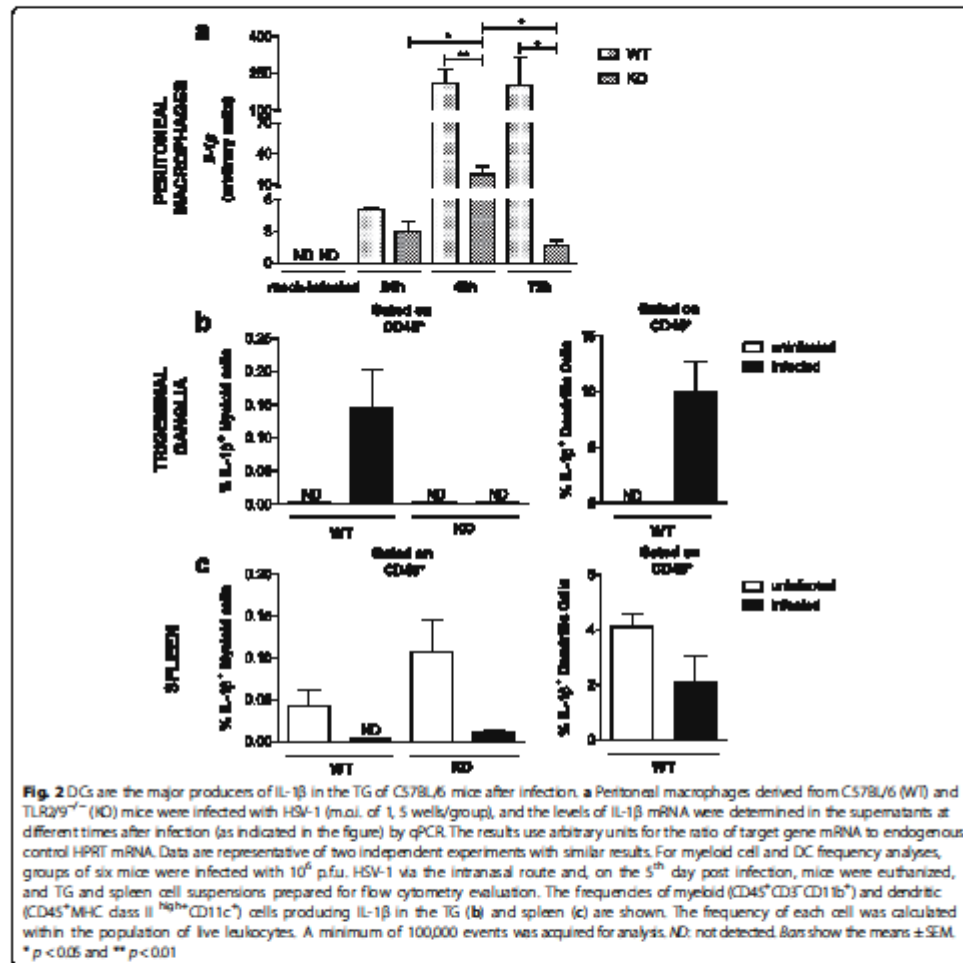
The mouse colonies and all experimental procedures were performed according to the institutional animal care and use guidelines from CPqRR/FIOCRUZ. The project was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA from CPqRR/FIOCRUZ LW6/11 and LW-20/15). TLR2 and TLR9 knockout mice (TLR2^{-/-}) were obtained by crossing TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice (both generated at Osaka University, Japan) at the National Institutes of Health (NIH, USA) and by backcrossing them to the C57BL/6 background for eight generations. These

mice were kind gifts of Shizuo Akira and Alan Sher respectively. The C57BL/6 mice used as wild-type (WT) controls were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (CPqRR/FIOCRUZ) (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), where all of the mice were maintained in a pathogen-free barrier environment. Six- to 10-week-old male mice were anesthetized with ketamine and xylazine. The mice were intranasally infected with 1×10^6 plaque-forming units (p.f.u.) of purified HSV-1 as described previously [21]. The control mice were administered phosphate-buffered saline (PBS). In the experiments in Figs. 1, 2b-c, 3, 4, 6, 7, 8 and 9, the mice were euthanized 5 days after infection, because a previously performed kinetic analysis of viral growth and the cytokine response showed that the peak of virus and cytokine levels occurred on the 5th day after infection when this multiplicity of infection was used [8].

Intraperitoneal macrophages

Thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were obtained from either C57BL/6 or TLR2^{-/-} mice by peritoneal

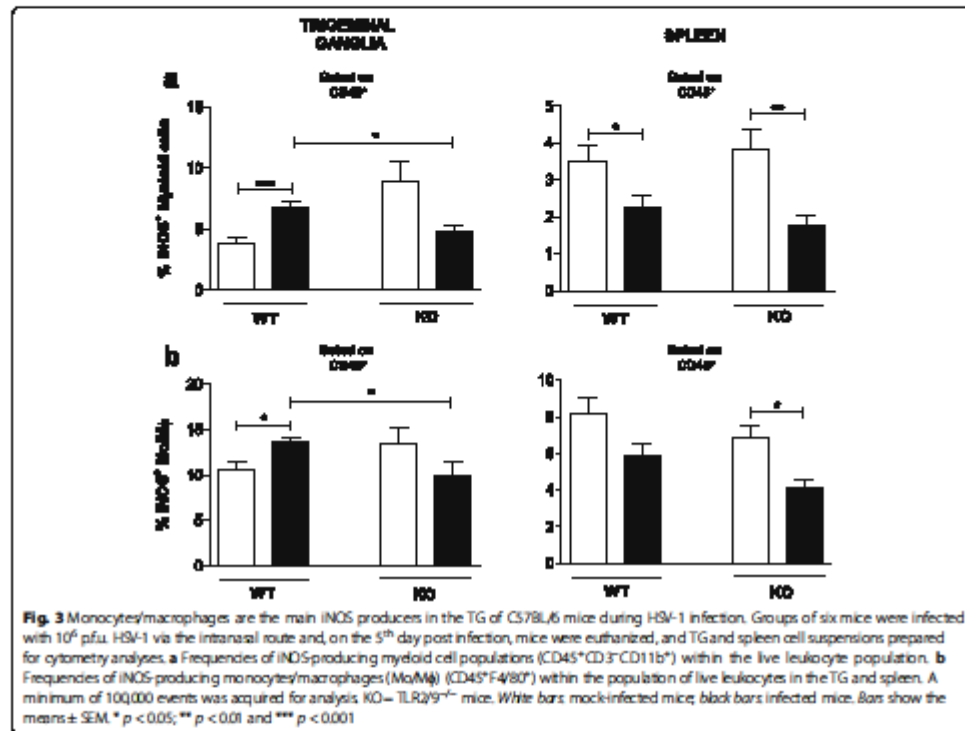




washing. Adherent peritoneal macrophages were cultured in 6-well plates in an atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C in DMEM supplemented with 5% FBS and antibiotics. A group of wells were infected with HSV-1 at a m.o.i. of 1. A second group was used as a control and did not receive any stimulus. All wells were then activated with sub-optimal concentration of murine IFN- γ (20 U/mL). At different time points (24, 48 and 72 h post infection), the cells were harvested, and the supernatant was collected and homogenized in TRIzol Reagent (Invitrogen) for RNA isolation and subsequent reverse transcription (RT) reaction.

RNA extraction and reverse transcription

Five days post infection, for the TG and spleen, and 3h and 24h post infection, for the lung tissues, were aseptically collected, homogenized in TRIzol (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at -70 °C until RNA extraction. RNA extraction was performed according to the procedures provided by the manufacturer of TRIzol reagent. Total RNA was treated with DNase (Promega, USA) and subjected to a RT reaction that used M-MLV enzyme (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions.



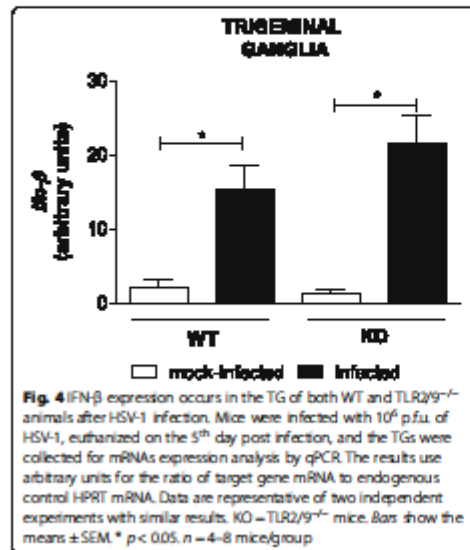
Quantitative PCR (qPCR)

qPCRs were performed to measure mRNA expression in the TG, lung, spleen tissues and peritoneal macrophages. The reactions were performed with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) in a 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Amplification was performed with SYBR Green PCR Master Mix using the following conditions: 95 °C for 10 min, followed by 50 two-step cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min and a final dissociation stage. The qPCR was performed with oligonucleotide primer pairs specific for the coding region of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (forward: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3', reverse: 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C-3'); granzyme B (GRZ-b) (forward: 5'-ACT TTC GAT CAA GGA TCA GCA-3', reverse: 5'-GGC CCC CAA AGT GAC ATT TAT T-3'); IL-10 (forward: 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3', reverse: 5'-ACC TGC TCC ACT GGC TTG CT-3'); IL-5 (forward: 5'-ACA GTG GTG AAA GAG ACC TT-3', reverse: 5'-TCC AAT GCA TAG CTG GTG ATT T-3'); chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL-2

or MCP-1) (forward: 5'-CTT CTG GGC CTG CTG TTC A-3', reverse: 5'-CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA-3') [22]; pro-interleukin 1 beta (pro-IL-1β) (forward: 5'-CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC-3', reverse: 5'-TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG-3'); interferon alpha 4 (IFN-α4) (forward: 5'-ACT CAT TCT GCA ATG ACC TCC A-3', reverse: 5'-AGA GGA GGT TCC TGC ATC ACA -3') and interferon beta (IFN-β) (forward: 5'-CTGGAGCAGCTGAATGGAAA-3', reverse: 5'-TGTCT GCTGGTGGAGTTTCAT-3'). A standard curve was prepared by serial dilution of the amplified DNA for each target gene. The standard curve method was used to analyze the data. The mRNA levels of the target genes were normalized to the expression of HPRT, the housekeeping gene. All reactions were done in duplicate.

Cytokine bead array analysis

MCP-1 levels were measured in TG, lung, spleen and cervical lymph node tissues using Cytometric Bead Array kit (CBA, BD Biosciences Pharmingen, USA) according to the manufacturer's instructions. The tissues from mock infected and infected C57BL/6 and TLR2/



9^{-/-} mice were homogenized in PBS containing protease inhibitors (Complete mini [EDTA-free], Roche, Basel, Switzerland), and the supernatants were used for cytokine measurements.

Isolation of TG and splenic leukocytes

Single-cell suspensions were harvested from the TG and spleens of six C57BL/6 and six TLR2/9^{-/-} mock-infected (PBS) and infected (1x10⁶ p.f.u.) mice, 5 days after infection. TG were incubated with 2 mg/mL collagenase (Merck-Chemicals) for 30 min in 5% CO₂ at 37 °C. Single-cell suspensions were prepared by passing the TG and spleen through a 70- μ m nylon cell strainer (BD Biosciences). Splenocytes were then treated with ACK lysis buffer (BD Biosciences) on ice for two minutes. Samples were suspended in complete Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) and plated for flow cytometry analysis.

Flow cytometry analysis of cell populations and intracellular cytokine production

For flow cytometry analysis, BD GolgiPlug Protein Transport Inhibitor (BD Biosciences, San Jose, CA) was added, and cells were cultured for 10 h in 5% CO₂ at 37 °C. After incubation, cells were washed with FACS buffer (PBS with 2% FBS) and stained with Acqua Live/Dead (Invitrogen, USA) for 10 min at 4 °C for dead cell exclusion. Cells were washed and stained for surface molecules for 30 min at 4 °C, fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Cytfix/Cytoperm,

BD Biosciences, USA). After washing, cells were incubated with antibodies against intracellular antigens for 30 min at 4 °C. Cells were then washed and suspended in 200 μ L of FACS buffer for cytometry analysis. Data were collected using an LSR II (BD Immunocytometry Systems, USA) with Diva (BD Biosciences, USA). At least 100,000 gated events were acquired. Representative FACS density plots showing the gate strategy for the identification of IL-1 β within CD11c⁺MHCII^{high} and iNOS within F4/80⁺ gated on live CD45⁺ leucocytes in the trigeminal ganglia and spleen from a single HSV1-infected wild type mouse were done on Additional file 1: Figure S1 and Additional file 2: Figure S2, respectively.

The antibody panels used to define the cell subpopulations included the following: anti-CD11c PE-Cy7 (clone N418), anti-F4/80 eFluor 450 (clone BM8), anti-CD45.2 Alexa Fluor 700 (clone 104), anti-NK1.1 APC-eFluor 780 (clone PK136), anti-IL-1 β pro-form APC (clone NJTEN3), anti-granzyme B PE-Cy7 (clone 16G6) and anti-perforin FITC (clone eBioOMAK-D), all purchased from eBioscience, USA; anti-I-4/I-E biotin (clone 2G9), anti-CD8a PE (clone 53-6.7) and anti-CD3e PerCP (clone 145-2C11), purchased from BD Pharmingen, USA; streptavidin Qdot 605 and anti-CD4 Qdot 605 (clone RM4-5), purchased from Invitrogen, USA; anti-CD11b Brilliant Violet 570 (clone MI/70), purchased from BioLegend, USA; and anti-iNOS/NOS Type II FITC (clone 6/iNOS/NOS Type II), purchased from BD Transduction Laboratories, USA. Data were analyzed with FlowJo (Tree Star) software. The expression of myeloid markers was analyzed after gating on CD45⁺CD3⁻ live cells.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software for Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The sample groups were assessed by non-parametric or parametric tests depending on Kolmogorov-Smirnov normality. The Mann-Whitney test was used for nonparametric data, and an unpaired *T* test was used for parametric data.

Results

More dendritic cells and monocytes/macrophages are present in the TG of infected WT mice than mock-infected WT mice, in contrast to TLR2/9^{-/-} mice

Cell population profiles in the TG and spleen of C57BL/6 and TLR2/9^{-/-} mice were analyzed without infection and on the 5th day of HSV-1 infection using flow cytometry (Fig. 1). The percentage (%) of leukocytes (CD45⁺) and myeloid cells (CD45⁺CD3⁻CD11b⁺) increased in the TG of WT and TLR2/9^{-/-} mice after HSV-1 infection (Fig. 1a). In the spleen, the % of myeloid cells was also larger in the infected groups. However, the global leukocyte % decreased in the spleen in both groups after

infection (Fig. 1a). Further analysis of the cell profile in the TG showed that the % of DCs and Mo/M ϕ was larger in infected WT mice than in mock-infected WT mice, while there were no significant alterations in the presence of these two cell types in infected and mock-infected TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 1b). The % of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes present did not differ significantly in infected and mock-infected WT mice, whereas these cell populations were larger in infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice. In contrast, the % of NK T cells in the TG was smaller in infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, whereas the WT mice presented no significant difference in the % of this cell population in infected and mock-infected mice. The NK cells in the TG presented the same profile in WT and TLR2/9^{-/-} infected and mock-infected mice. In the spleen, the % of DCs and CD4⁺ T lymphocytes was smaller in infected than in mock-infected WT and TLR2/9^{-/-} mice. The % of CD8⁺ T lymphocytes was lower in the spleen of infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, but the profile of CD8⁺ T lymphocytes in the spleen of infected and mock-infected WT mice was similar. The number of NK T cells in the spleen did not change significantly with the infection of WT and TLR2/9^{-/-} animals, although the percentage of NK T cells in infected WT mice was larger than that in the TLR2/9^{-/-} mice. There were more NK cells in infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, while there was no difference between infected and mock-infected WT mice. Finally, in the spleen, there was a lower % of Mo/M ϕ in the mock-infected mice than in the infected WT and TLR2/9^{-/-} mice.

Dendritic cells are the main producers of IL-1 β in the TG and are crucial for HSV-1 defense

The kinetics of IL-1 β mRNA transcription in peritoneal M ϕ from WT and TLR2/9^{-/-} mice were analyzed by qPCR at different time points following *in vitro* infection (Fig. 2a). Prior to infection, IL-1 β mRNA was not detected in peritoneal M ϕ from either group of animals. Following infection, M ϕ derived from WT mice exhibited a higher mRNA level of IL-1 β 48 and 72 h post infection, while the IL-1 β mRNA level from the TLR2/9^{-/-} mice showed a slight increase with a peak at 48 h of infection; however, this level was lower than that in the WT mice and was followed by a decrease at the next time point. These results showed that the absence of TLR2 and TLR9 has a strong negative effect on IL-1 β mRNA level. Thus, to identify the major IL-1 β -producing cell in the TG and spleen of WT and TLR2/9^{-/-} mice, we performed flow cytometry analysis (Fig. 2b, c and Additional file 1: Figure S1). Our data showed that the main IL-1 β response against infection occurs in the TG (Fig. 2b, left and Additional file 1: Figure S1a), as indicated by the high % of cells producing this cytokine in

this tissue (with no significant differential detection in the spleen) (Fig. 2c and Additional file 1: Figure S1b) and that myeloid cells derived from TLR2/9^{-/-} mice were unable to produce this cytokine, as shown by the impaired production in the TG observed in mock-infected and infected mice (Fig. 2b, left). Since no detectable production of IL-1 β by myeloid cells was seen in the TG of TLR2/9^{-/-} mice, we performed the subsequently analysis (Fig. 2b, right) only in the WT group. Thus, among the cell populations evaluated, it was discovered that DCs (Fig. 2b, right) are the major cell producing IL-1 β in the TG during infection.

Monocytes/macrophages are the most important producer of iNOS and have a pivotal role against HSV-1

To determine the primary tissue producing iNOS, which is essential for establishing an efficient immune response against HSV-1, a previous study from our group evaluated the levels of iNOS in the TG and brain of WT and TLR2/9^{-/-} mice through qPCR and an immunofluorescence assay. The data suggested that iNOS is expressed in a TLR-dependent manner and identified Mo/M ϕ as the primary iNOS-producing cells important for mouse survival [6]. Thus, to evaluate the production of iNOS at the local and systemic levels and identify other types of cells producing this molecule, we checked iNOS production in the TG and spleen of WT and TLR2/9^{-/-} mice through flow cytometry analysis (Fig. 3a, b and Additional file 2: Figure S2).

Our results showed an increase in the % of myeloid cells producing iNOS in the TG of infected WT mice; this was unlike in TLR2/9^{-/-} mice, which exhibited no statistically difference in the % of cells producing this molecule during infection (Fig. 3a, left). On the other hand, spleens from both WT and TLR2/9^{-/-} infected mice presented a reduction in the % of myeloid cells producing iNOS (Fig. 3a, right). In addition, a greater percentage of iNOS-producing Mo/M ϕ was found in the TG of WT mice during infection compared to TLR2/9^{-/-} infected mice (Fig. 3b and Additional file 2: Figure S2a). The spleens from WT and TLR2/9^{-/-} infected mice presented similar profile of Mo/M ϕ producing iNOS (Fig. 3b and Additional file 2: Figure S2b).

Type I interferon expression in the TG is higher in infected than in mock-infected WT and TLR2/9^{-/-} animals 5 days after infection

The mRNA expression level of type I IFNs during HSV-1 infection was evaluated in the TG of WT and TLR2/9^{-/-} mice on the 5th day after infection using qPCR. In the TG of both the WT and TLR2/9^{-/-} infected groups, the levels of IFN- β mRNA increased relative to their respective control groups (Fig. 4). Nevertheless, no difference was observed between WT and TLR2/9^{-/-} infected mice. As the virus was administered intranasally and type I IFNs are

generally expressed earlier, we also decided to evaluate their expression in the first few hours of infection in the lungs.

The expression of Type I interferons in the first 3 and 24 h after infection in the lung, in contrast, is higher only in the WT animals

The expression of type I IFNs mRNA in the lungs was measured 3 and 24 h after infection. The WT mice showed an increase in IFN- β mRNA level, which reached a higher level of expression at 24 h post infection, while the TLR2/9^{-/-} mice exhibited a marked decrease in the mRNA level of this cytokine at this time (Fig. 5a). A similar pattern in mRNA levels was also observed for IFN- α 4 in the lungs of WT and TLR2/9^{-/-} infected mice (Fig. 5b).

Infected mice generate more MCP-1 in the trigeminal ganglia and spleen than mock-infected mice

As reported previously, during HSV-1 infection, the chemokine MCP-1 is overexpressed in the TG of TLR2/9^{-/-} infected mice [8]. Thus, to better understand how the response of this protein occurs, MCP-1 expression and production in the TG, spleen and lung was evaluated.

A higher level of MCP-1 was produced in the TG and spleen of WT infected mice relative to mock-infected mice. Higher production of MCP-1 was observed in the TLR2/9^{-/-} infected mice relative to WT infected mice (Fig. 6a). The same production profile was observed in the spleen (Fig. 6b). In the lung, the infected TLR2/9^{-/-} mice showed higher levels of MCP-1 than the mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, whereas in WT mice, there was no differential production of this protein (Fig. 6c).

Granzyme B is produced by CD8⁺ T and NK lymphocytes

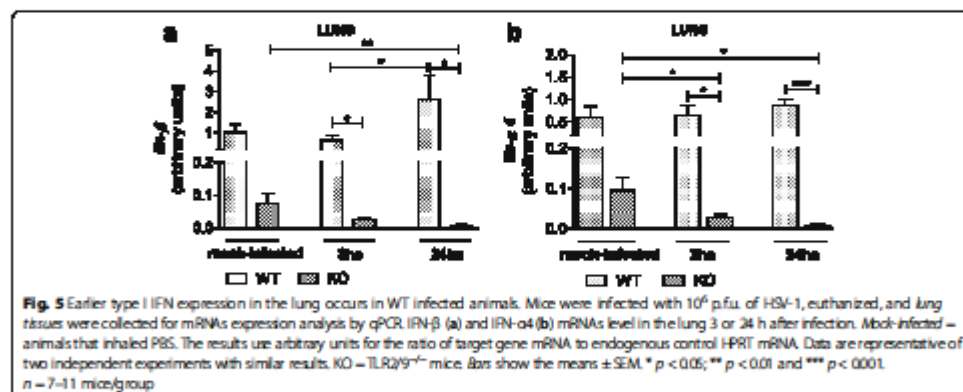
To better understand the mechanism underlying the immune response against HSV-1, the role of granzyme B during HSV-1 infection was also evaluated (Fig. 7).

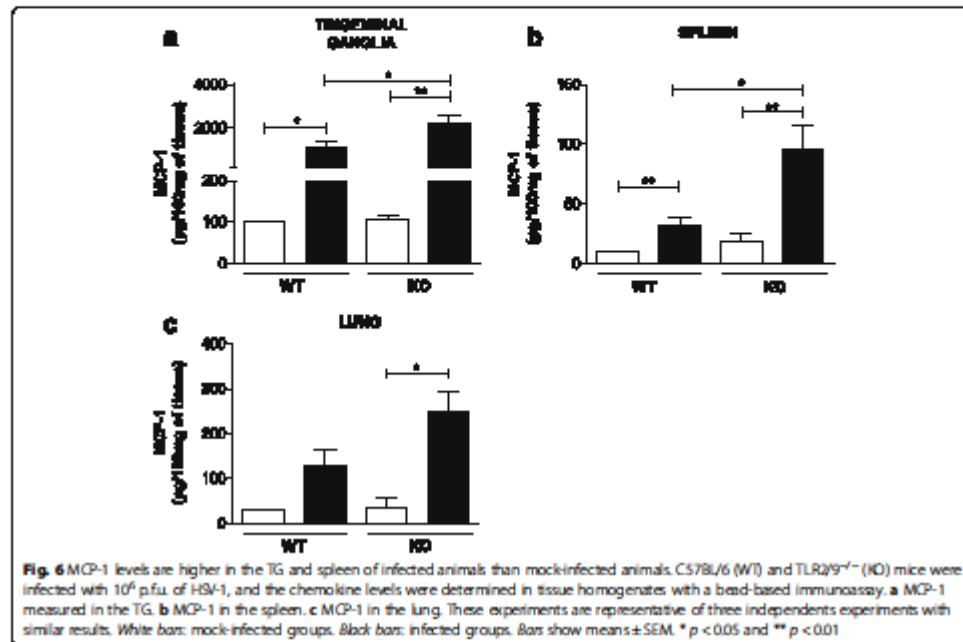
Therefore, we evaluated the mRNA levels of granzyme B in the TG and spleen of WT and TLR2/9^{-/-} mice and identified the cell types producing this molecule in these tissues during HSV-1 infection.

The mRNA level of granzyme B in the TG and spleen of infected mice was higher than that in mock-infected animals for both the WT and the TLR2/9^{-/-} animals, although the mRNA level in the infected TLR2/9^{-/-} mice was much higher than that in the WT mice (Fig. 7a). Thus, the next step was to identify the cells responsible for granzyme B production. Although the production of granzyme B in the spleen of WT infected compared to mock infected animals occurred distinctly only by NK cells, this molecule was also produced by other population of cells, though there was no statistical difference between the mock-infected and infected groups (Fig. 7c-f, right). The same was observed in the trigeminal ganglia (Fig. 7c-f, left). In this case, the production of granzyme B in WT animals occurred mainly through NK and CD8⁺ cells (Fig. 7e and f, left). However, in the TLR2/9^{-/-} mice, several cell types in the spleen, such as CD4⁺, CD8⁺, NK T and NK cells, produced granzyme B when we compared infected and mock-infected mice (Fig. 7c-f, right). Furthermore, analysis of a gate containing all granzyme B-positive cells confirmed that TG cells from TLR2/9^{-/-} mice not only show higher mRNA levels but also produce more granzyme B than WT mice, as observed for the spleen (Fig. 7b).

CD8⁺ T lymphocytes are the main cell producing perforin in the spleen, while the perforin produced in the TG seems to be irrelevant

Furthermore, the production of perforin was evaluated after HSV-1 infection. A comparison of the infected and mock-infected WT and TLR2/9^{-/-} groups showed that the overall production of perforin in the TG by several





cell types (such as CD4⁺, CD8⁺, NK T and NK cells) was not statistically significant during infection (Fig. 8a-d). However, in the spleen, CD8⁺ T lymphocytes from the infected mice produced more perforin than the mock-infected cells. Additionally, the infected TLR2/9^{-/-} mice produced more perforin than the infected wild-type mice (Fig. 8b, right).

TLR2/9^{-/-} mice exhibit a mix of Th1 and Th2 immune responses

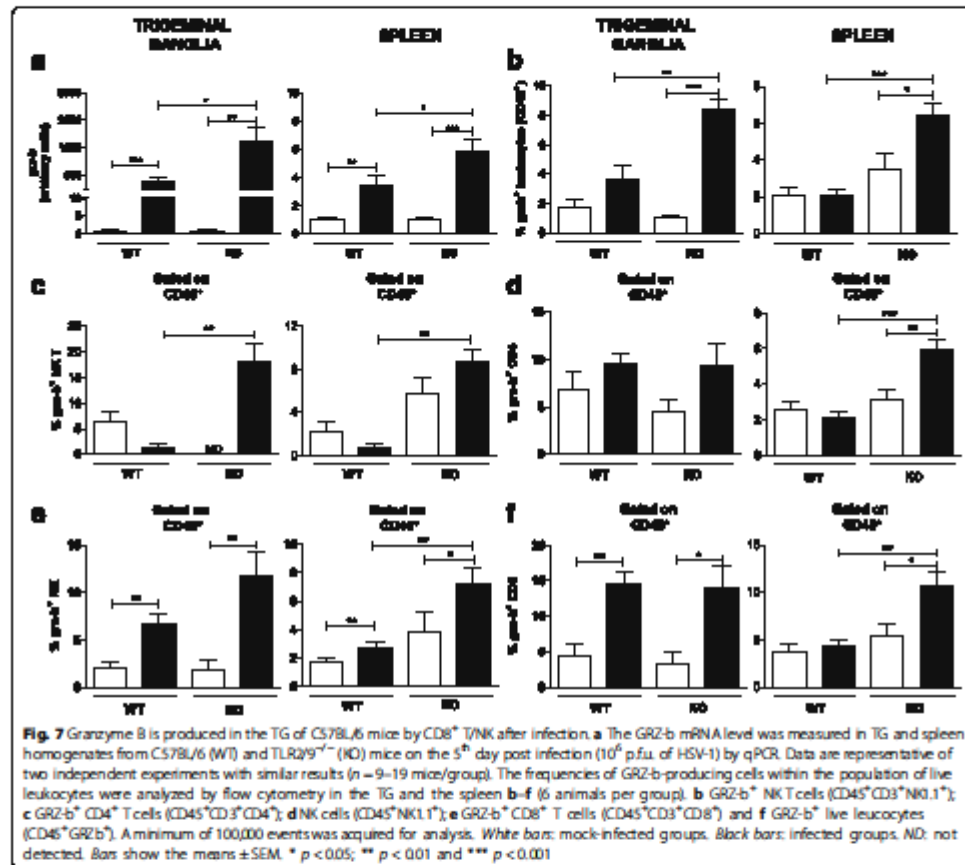
Therefore, realizing that TLR2/9^{-/-} mice were less effective in protecting against HSV-1 [8] and that they produced less IL-1 β and iNOS, typical molecules in the Th1 immune response, we analyzed the mRNA levels of IL-10, a regulatory cytokine in the immune response, and IL-5, an important component of the Th2 immune response, on the 5th day post infection using qPCR. The infected WT mice exhibited a lower level of IL-5 mRNA and a higher level of IL-10 mRNA than the mock-infected WT mice but a much lower mRNA level of IL-10 than the infected TLR2/9^{-/-} mice.

Surprisingly, the TLR2/9^{-/-} infected mice exhibited an exacerbated response with regard to these two cytokines, indicating that a strong regulatory response was possibly being mediated by IL-10 due to the increased mRNA levels of chemokines in the TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 9a).

Additionally, a Th2-skewed response also occurred in the TLR2/9^{-/-} mice, which exhibited higher levels of IL-5 mRNA (Fig. 9b), suggesting a mixed Th1 and Th2 immune response in the TLR2/9^{-/-} mice.

Discussion

Several studies have attempted to understand the main mechanisms involved in the immune response and identify the key components responsible for the recognition and establishment of an efficient immune response against HSV-1 [9, 15, 23–26]. Data from our group and from other studies have highlighted the key role of TLR2 and TLR9 in the recognition and activation of the immune response against HSV-1 infection and have suggested synergistic action of these receptors in the establishment of an effective response, since all the WT animals survive the infection, while all the TLR2/9^{-/-} mice die after infection [6, 8, 27, 28]. Furthermore, our group discovered that this immune response is mainly localized in the TG with the important role of the MyD88 adapter molecule along with IFN- γ and iNOS during infection. In the TG, after infection, a viral transcript and viral protein were identified [6, 8, 9]. Thus, continuing our studies, this work attempted to extend our knowledge of the immune response against HSV-1 by identifying the immune cells involved and the

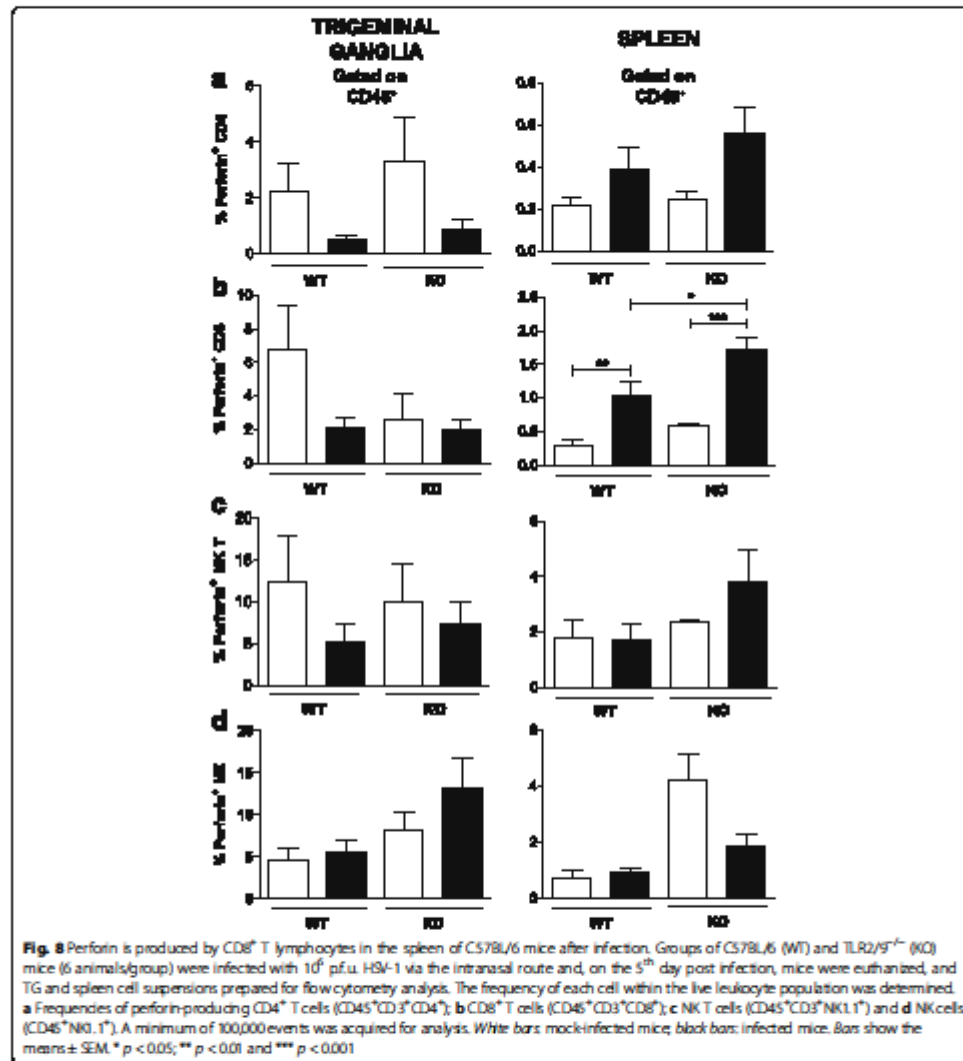


molecules produced as a result of their activation to obtain an effective response.

We showed that the % of Mo/Mφ and DCs are higher in the TG of infected than mock-infected WT mice (Fig. 1b), which differs from what occurs in TLR2/9^{-/-} mice. These leukocytes are important components of the innate immune system as they play a crucial role in activating the antiviral cell-mediated immune response and also in producing important immune mediators [29–31]. During HSV-1 primary infection they act limiting viral replication and maintaining the latency state but also, activating the adaptive immune response [32]. Macrophages are especially important in phagocyte infected and apoptotic cells but also through the release of pro-inflammatory cytokines, as well as other immune mediators such as nitric oxide [33, 34]. Dendritic cells, in turn, are crucial for antigen presentation and,

thus, trigger the adaptive immune response as was previously reported [35–38].

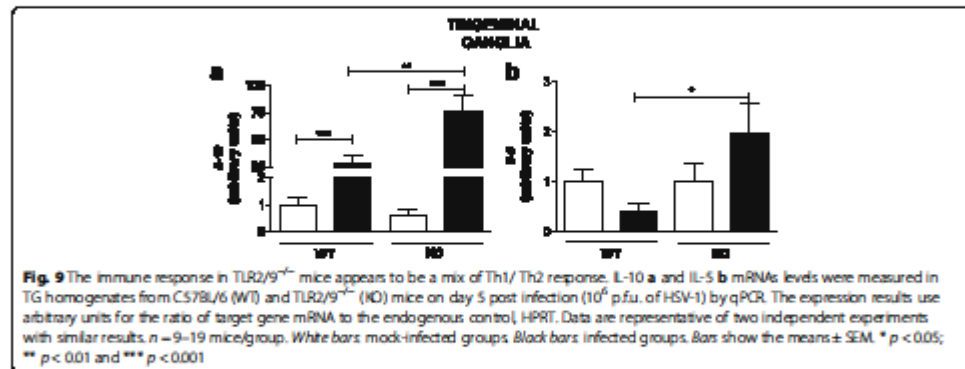
Furthermore, we showed that both the IL-1β mRNA [8] and protein level (Fig. 2b) are higher in the TG of infected than mock-infected WT mice. There was a drastic decrease in IL-1β in TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 2b). This shows that IL-1β production is probably not down modulated by viral post-transcriptional modification, since HSV-1 is a complex virus with several evasion mechanisms, including inhibition of the translation of host proteins [39–41]. Importantly, it was discovered that among the studied cells, DCs in the TG of WT mice were the major cells producing IL-1β (Fig. 2b and Additional file 1: Figure S1a). As IL-1β is a cytokine with a major role to initiate the inflammatory process after an infection [42–44], this was also showed during the HSV-1 infection. Likewise, previous studies revealed that IL-



1 β deficiency is lethal to mice and demonstrated its important role in repairing pathological insults due to HSV-1 infection within the central nervous system [45, 46]. In TLR2/9^{-/-} mice the decreased IL-1 β level could be one of the reasons for their highly mortality [8].

Zolini and collaborators (2014) [6], in addition to highlighting the TLR-dependence, showed that macrophages are the producers of iNOS, an important host defense

protein [47, 48] in the TG. We confirmed that Mo/M ϕ were the primary iNOS-producing cells (Fig. 3a, b and Additional file 2: Figure S2) in the TG and that DCs were not good producers of iNOS. Other studies have also highlighted the important role of this molecule in host defense and indicate M ϕ as the main source, which is in line with our results [33, 34, 49, 50]. In other words, IL-1 β together with iNOS is essential in mediating the local



(TG), but not systemic (spleen), immune response against HSV-1. Additionally, these two molecules are TLR2/9 dependent, as TLR2/9^{-/-} mice produce them at low levels (Figs 2 and 3), and, in contrast to WT mice, these mice died after infection [8].

IFN- β transcript, however, is detected in both WT and TLR2/9^{-/-} mice in the TG on the 5th day after infection (Fig. 4), indicating that this response seems to be TLR-independent. However, at the beginning of the infection, the type I IFN (IFN- α and IFN- β) mRNA levels in the lung of WT mice were higher than those in the infected TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 5a, b). As the response of these cytokines occurs early during a viral infection, their mRNA levels were down regulated in the lungs of TLR2/9^{-/-} mice in the first hours after intranasal infection. In other studies [32, 51–54] it was demonstrated that type I IFNs certainly play an essential role in the immune response in restricting viral infections and shaping the adaptive immune response.

Down regulation of the levels of IL-1 β and iNOS in TG occurs simultaneously with overexpression of other molecules as MCP-1 and granzyme B in TLR2/9^{-/-} infected mice. The increase in MCP-1 mRNA levels after HSV-1 infection was already observed in the TG of TLR2/9^{-/-} mice in our previous study [8]; however, in the present work, the increase in MCP-1 was confirmed at the protein level in the TG and spleen as well (Fig. 6a, b). Thus, MCP-1 seems not to depend on TLRs to be expressed/produced. Alternatively, MCP-1 down regulation could depend on these receptors, since its mRNA and protein levels are higher in TLR2/9^{-/-} mice than WT mice after infection. As MCP-1 attracts monocytes, basophils, NK and T cells, its presence at these initial sites of HSV-1 infection could play a role in preventing the spread of virus to neighboring tissues [55], but these cells in TLR2/9^{-/-} mice lack functional TLR2 and TLR9, resulting in nonfunctional cells and in a nonfunctional

immune response. Several studies have highlighted the relevance of MCP-1 in mediating the immune response against HSV-1, however its exactly role is not yet completely understood [25, 56–59].

Since our previous studies have indicated the importance of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells in the control of HSV-1 infection in WT mice [8], we decided to evaluate the role of the granzyme B and perforin molecules and identify the primary cells producing these molecules. Notably, granzyme B (a serine protease) and perforin (a pore-forming protein) are important components of the immune response, as they confer the cytotoxic activity of NK cells and CD8⁺ T lymphocytes [60–62]. Moreover, these molecules, when released within the target cell, cause DNA fragmentation and rapid loss of membrane integrity, leading to cell apoptosis and, consequently, viral clearance [63, 64]. It was shown that granzyme B mRNA levels in the TG and spleen of infected WT mice were higher than those in mock-infected animals (Fig. 7a). The TLR2/9^{-/-} infected mice also showed a higher mRNA level of granzyme B than mock-infected mice and even a higher level than the WT mice. Thus, this high level of granzyme B in TLR2/9^{-/-} mice together with lower production of IL-1 β and iNOS is not sufficient to control the infection, resulting in mortality (as reported in [8]). It was shown that among the studied cells, NK and CD8⁺ T cells are the major cells producing granzyme B in the TG, while in the spleen only the NK cells produced it (Fig. 7e, f). In TLR2/9^{-/-} mice TG large amount of granzyme B was produced by NK T, NK and CD8⁺ cells after infection (Fig. 7c, e-f). The production of granzyme B by NK T cells from the spleen of TLR2/9^{-/-} mice was even higher than that observed in the WT mice (Fig. 7c). In a more general analysis of the number of leukocytes producing granzyme B in the TG and spleen in the WT and TLR2/9^{-/-} infected mice, the production of granzyme B was higher in

the TLR2/9^{-/-} mice than in the WT mice (Fig. 7b). Thus, in the WT infected mice, granzyme B could be mediating cell cytotoxic activity, regulating the immune response and interfering in HSV-1 reactivation in the TG, as previously evidenced in other studies [61, 65–67]. In contrast, in the infected TLR2/9^{-/-} mice, the high level of granzyme B could be contributing to an exacerbated immune response and the pathogenesis of the infection, contributing to animal death [68]. However, the regulation of perforin is different, with consistent basal production by all tested cells (CD4⁺, CD8⁺, NK T and NK cells) in the TG of mock-infected WT mice (Fig. 8a-d, left). This was also observed in the TG of TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 8a-d, left). However, in the spleen, perforin was differentially produced by CD8⁺ T cells, which exhibited an increased % of perforin-positive cells after HSV-1 infection in both WT and TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 8b, right). Thus, in the TG of WT mice, the basal levels of perforin seemed to be sufficient for its role in mediating cytotoxicity activity [63, 69, 70], or if the release of granzyme B occurs in a perforin-independent manner, it would not be necessarily functional [63, 71, 72]. However, in the TLR2/9^{-/-} mice, perforin possibly was not acting in viral clearance but contributing to the immunopathogenesis of infection, as previously described [63, 73, 74].

Another remarkable finding was that the IL-10 mRNA levels, which plays an important role in controlling the levels of pro-inflammatory cytokines [75–77] were higher in the TG of both WT and TLR2/9^{-/-} mice after HSV-1 infection (Fig. 9a). The mRNA levels were even higher in the TLR2/9^{-/-} mice than in the WT mice. Thus, IL-10 does not seem to depend on TLRs to increase its mRNA levels, or perhaps down regulation is TLR dependent. During HSV-1 infections, IL-10 was shown to control the production of immune mediators by microglial cells and corneal immunopathology in stromal keratitis [78–80]. Thus, the high levels of IL-10 mRNA observed in the TG of TLR2/9^{-/-} mice could be an attempt to control the exacerbated immune response triggered by the cells that were attracted by the high levels of MCP-1, whereas in the WT mice, its expression could be sufficient to control the immune response triggered by HSV-1. Surprisingly, increased levels of IL-5 mRNAs were observed in the TG of infected compared to mock-infected TLR2/9^{-/-} mice and also compared to WT infected mice (Fig. 9b). IL-5 is an important component of the Th2 immune response that is known to act not only in response to extracellular parasites and allergens but also in maintaining metabolic homeostasis and tissue repair [81, 82]. Type 2 immune responses are also known to play a regulatory role in limiting type 1 immune responses and the extent of its damage, as well

[83]. IL-5, produced primarily by T helper type 2 cells and mast cells, induces B cell differentiation into antibody-producing cells and enhances the proliferation and differentiation of eosinophils [84, 85]. However, the production of IL-5 during an immune response can also lead to tissue damage, mainly through the excess activity of eosinophils [86, 87]. Therefore, the high IL-5 mRNA levels in the TG of TLR2/9^{-/-} infected mice could be contributing to their ineffective immune response.

Conclusions

Altogether, this work has highlighted, among the studied cells, the main cells (DCs, Mo/Mφ, CD8⁺ T lymphocytes) that produce the molecules (IL-1β, iNOS, granzyme B) in the key organ (TG) of the body that controls the immune response against HSV-1. Additionally, it was shown that, very early after infection, type I IFNs (IFN-α and IFN-β) are expressed by cells in virus-infected tissue and, also, that MCP-1 chemokine showed to be important in the HSV-1 response, since it attracts the immune cells to the site of infection. Beyond uncovering more knowledge about the host response to HSV-1, these data could help scientists develop efficient vaccines, treatments or diagnostic and prognostic approaches for HSV-1.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Representative FACS density plots showing the gate strategy for the identification of IL-1β within CD11c⁺ MHCII⁺ gated on live CD45⁺ leucocytes in the trigeminal ganglia (a) and spleen (b) from a single HSV1-infected WT mouse. A minimum of 100,000 events was acquired for analysis (PPTX 386 kb)

Additional file 2: Figure S2. Representative FACS density plots showing the gate strategy for the identification of iNOS within F4/80⁺ gated on live CD45⁺ leucocytes in the trigeminal ganglia (a) and spleen (b) from a single HSV1-infected WT mouse. A minimum of 100,000 events was acquired for analysis (PPTX 2700 kb)

Abbreviations

CBA: Cytometric bead array; DCs: Dendritic cells; DMBM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; dpi: Day post infection; FACS buffer: PBS with 2% FBS; FBS: Fetal bovine serum; GRZ-β: Granzyme B; HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HSV-1: Herpes simplex virus type 1; IFN: Interferon; IL: Interleukin; iNOS: Nitric oxide synthase; m.o.i.: Multiplicity of infection; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; Mo/Mφ: Monocyte/macrophage; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; Mφ: Macrophage; NK: Natural killer; NO: Nitric oxide; p.f.u.: Plaque-forming unit; PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns; PBS: Phosphate buffered saline; PRRs: Pattern recognition receptors; qPCR: Quantitative PCR; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; RT: Reverse transcription; TG: Trigeminal ganglia; TLR2/9^{-/-}: TLR2 and TLR9 knockout; TLR2^{-/-}: TLR2 knockout; TLR9^{-/-}: TLR9 knockout; TLRs: Toll-like receptors; WT: Wild type

Acknowledgements

Funding

Work supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), to MAC, MMF and EGK, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), to AMWM, EGK, LRVA, MMF and MAC, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas/

CNPq/FAPEMIG (INCT/CNPq/FAPEMIG, Brazil), to AMMM, LRVA, MAC), and the Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde VI (PAPES)/HOCRUZ/CNPq (Brazil, to MAC). AMMM, EGK, LRVA and MAC are Fellows from CNPq. The authors thank the program for technological development in tools for health-POIIS/HOCRUZ for the use of its facilities.

Availability of data and materials

All data and Informations are available without restriction and included in the manuscript and supplementary figures.

Authors' contributions

AMMM, EGK, LRVA and MAC conceived and designed the experiments. AMF, BSASS, GK, MMF, NL, NLP, performed the experiments. NL performed the statistical analyses. EGK, LRVA, NL, MMF and MAC analyzed the data. EGK, MAC and LRVA contributed reagents, materials, and analysis tools. NL, EGK, LRVA and MAC wrote the paper. Correspondent author: MAC. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

This project was approved by the Ethical Committee of Animal Handling (CEUA) from HOCRUZ, Brazil (LW-6/11 and LW-20/15).

Author details

¹Imunologia de Doenças Virais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil. ²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil. ³Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil. ⁴Biologia e Imunologia Parasitária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil.

Received: 6 December 2016 Accepted: 18 January 2017

Published online: 21 February 2017

References

- Arduini PG, Porter SR. Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinicopathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:107-21.
- Fellett PE, Rotzman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields: Virology* 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1802-22.
- Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate Immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- Anderen LL, Mark N, Reinert LS, Kolbe Olsen E, Narita R, Jørgensen SE, et al. Functional IIR3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis. *J Exp Med.* 2015;212:1371-9.
- Lim HK, Seppänen M, Huotila T, Ciancanelli MJ, Ihan Y, Lafaille FG, et al. TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: high allelic heterogeneity and recurrence risk. *Neurology.* 2014;83:1888-97.
- Zollini GP, Lima GK, Lucinda N, Silva MA, Dias MF, Pessoa NL, et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by ILCs and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *J Neuroinflammation.* 2014;11:20.
- Sando-SNimbu V, de Diego RP, Lorenzo L, Hakwari R, Alangiri A, Isaacszen E, et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest.* 2011;121:4889-902.
- Lima GK, Zollini GP, Mansur DS, Lima BHF, Wischhoff U, Astigarraga RG, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during Herpes simplex virus 1 infection. *Am J Pathol.* 2011;177:2483-45.
- Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RME, Rodrigues SCO, Akita S, et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with Herpes simplex virus 1. *Am J Pathol.* 2005;166:1419-26.
- Chew T, Taylor KE, Mossman KL. Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses.* 2009;1:979-1002.
- Paludan SR, Bowie AG, Hazan KA, Fitzgerald KA. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:143-54.
- Levy DE, Marié IJ, Durbin JE. Induction and function of type I and II interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol.* 2011;1:476-86.
- Delhaye S, Paul S, Bakopari G, Minet M, Weber F, Staehele P, et al. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7835-40.
- Stetson DB, Medzhitov R. Type I Interferons in host defense. *Immunity.* 2006;25:373-81.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akita S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activates murine natural interferon-producing cells (IPC) through toll-like receptor 9. *Blood.* 2004;103:1433-8.
- Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:432-6.
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci.* 2010;99:1654-73.
- Aoyagi H, Tsuchikawa K, Iwaki S. Three-dimensional observation of the mouse embryo by micro-computed tomography: composition of the trigeminal ganglion. *Otolaryngology.* 2010;98:26-30.
- Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St John JA, Ebbert JW, et al. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:691-726.
- Nogueira ML, Carvalho AF, Barbosa EF, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Diagnosis of mucocutaneous herpetic infections by PCR without DNA extraction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:13-4.
- Bolin G, Coulombe Z, Rivest S. Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur J Neurosci.* 2002;16:29-43.
- Gültepe A, Overbergh L, Wildix D, Decalonne B, Bouillon R, Mazhieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2012;53:386-401.
- Casrouge A, Zhang S-Y, Henschenck C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-98B deficiency. *Science.* 2006;314:308-12.
- Hochrein H, Schlatter B, O'Keefe M, Wagner C, Schmitz F, Schlemm M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:11416-21.
- Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:1315-20.
- Zhang S-Y, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science.* 2007;317:1522-7.
- Sørensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, Bartholdy C, Thomsen AR, Paludan SR. TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J Immunol.* 2008;181:8604-12.
- Sato A, Linehan MM, Iwasaki A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:17343-8.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2010;11:6343-53.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:723-37.
- Milfner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014;40:642-56.
- Egan KP, Wu S, Wjgdahl B, Jennings SR. Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol.* 2013;19:328-45.
- Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology.* 2005;339:52-59.
- Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol.* 1999;162:2885-905.
- Matt KR, Ghiasi H. Role of dendritic cells in enhancement of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation in vaccinated mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1899-67.
- Matt KR, Allen SJ, Zandian M, Konda B, Sharif BG, Jones C, et al. CD8 α dendritic cells drive establishment of HSV-1 latency. *PLoS One.* 2014;9:e9444.
- Donaghy H, Borjaski L, Harman AN, Mandan V, Tyring SK, Meng T, et al. Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection. *J Virol.* 2009;83:1952-61.

38. Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishikawa T, Matsuo N, Nakano A, et al. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med*. 2005;200:425–35.
39. Melchjorsen J, Matikainen S, Paludan SR. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses*. 2009;1:737–59.
40. Su C, Zhan G, Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Vrol J*. 2016;13:38.
41. Szafo PA, Ibañez FJ, Retamal-Díaz AR, Paz-Hibias MV, Burro SM, Kaleris AM, et al. Evasion of early antiviral responses by herpes simplex viruses. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–16.
42. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–50.
43. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39:1003–18.
44. Shafiq SS, Griffin WS, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*. 2008;5:7.
45. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. *J Neurosci*. 2001;21:7046–52.
46. Sargerieff Y, Rivest S, Bolvin G. Tumor necrosis factor- α and Interleukin-1 β play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis*. 2007;196:853–60.
47. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunity*. 2001;15:17–26.
48. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2:907–16.
49. Gamba G, Cavalieri H, Courages MC, Massouh EJ, Benedita F. Early inhibition of nitric oxide production increases HSV-1 intranasal infection. *J Med Virol*. 2004;76:313–22.
50. Madjan A, Wei XQ, Huang FR, Al-Alem UAH, Chan WL, Liew FY. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. *J Gen Virol*. 1998;79:25–30.
51. Low-Calle AM, Prada-Arimendi J, Castellanos JE. Study of Interferon- β antiviral activity against herpes simplex virus type 1 in neuron-enriched trigeminal ganglia cultures. *Virus Res*. 2014;180:49–58.
52. Rozzo PC, Leib DA. Neuronal Interferon signaling is required for protection against herpes simplex virus replication and pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1005028.
53. Steiner J, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13:414–8.
54. Wang JP, Bowen GN, Zhou S, Cerny A, Zacharia A, Kriple DM, et al. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. *J Virol*. 2012;86:273–81.
55. Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog*. 2010;6:1–4.
56. Carr DJ, Chodosh J, Ash J, Lane TE. Effect of anti-CXCL10 monoclonal antibody on herpes simplex virus type 1 keratitis and retinal infection. *J Virol*. 2008;77:10087–96.
57. Carr DJ, Tomarek L. Herpes simplex virus and the chemokines that mediate the inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;303:47–65.
58. Wuest TR, Carr DJ. Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the anti-viral response to HSV-1 infection. *J Immunol*. 2008;181:7985–98.
59. Wuest TR, Thapa M, Zheng M, Carr DJ. CXCL10 expressing hematopoietic-derived cells are requisite in defense against HSV-1 infection in the nervous system of CXCL10 deficient mice. *J Neuroimmunol*. 2011;234:108–8.
60. Ida H, Utz PJ, Anderson P, Eguchi K. Granzyme B and natural killer (NK) cell death. *Mod Rheumatol*. 2003;13:15–22.
61. Salti SM, Hammelev EM, Giewal JL, Reddy ST, Zemple SJ, Grossman WJ, et al. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2011;187:4301–9.
62. Vokobokik I, Dunstone MA, Baran K, Whistock JC, Trapani JA. Perforin structure, function, and role in human immunopathology. *Immunity*. 2010;32:35–54.
63. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:35–47.
64. Wagner C, Kling Konert C, Deneffeh B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*. 2004;103:1099–104.
65. Gruber-Bauk B, Arthur JL, Mayrhofer G. Importance of NK cells in resistance to herpes simplex virus: fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J Virol*. 2008;82:11073–83.
66. Knickelbain JE, Khanna RM, Yee MB, Baly CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Nontoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science*. 2008;322:268–71.
67. Pereira RA, Simon MM, Simmons A, Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of Herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *J Virol*. 2000;74:1029–32.
68. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med*. 2012;18:33–41.
69. Matlobian M, Suresh M, Glass A, Galvan M, Chow K, Whitmore JK, et al. A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol*. 1999;73:2527–36.
70. Kawamura K, Kadawaki N, Kitawaki T, Uchiyama T. Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells. *Blood*. 2006;107:1031–8.
71. Kogo J, Takeba Y, Kumai T, Kitadai Y, Matsumoto N, Ueno S, et al. Involvement of TNF- α in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res*. 2006;1122:201–8.
72. Motyka B, Korbut G, Piskorski MJ, Hebelin JA, Caputo A, Hrbman M, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000;103:491–500.
73. Chang E, Galle L, Maggs D, Estes DM, Mitchell WJ. Pathogenesis of herpes simplex virus type 1-induced corneal inflammation in perforin-deficient mice. *J Virol*. 2000;74:1832–40.
74. Johnson AJ, Chu C-F, Milligan GN. Effector CD4+ T cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. *J Virol*. 2008;82:9678–88.
75. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683–765.
76. O'Garra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:425–8.
77. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71–109.
78. Marques CP, Hu S, Sheng W, Cheema MC-J, Cox D, Lokensgard JR. Interleukin-10 attenuates production of HSV-induced inflammatory mediators by human microglia. *Glia*. 2004;47:58–66.
79. Sarangi PP, Sehrawat S, Sivas S, Rouse BT. IL-10 and natural regulatory T cells: two independent anti-inflammatory mechanisms in herpes simplex virus-induced ocular immunopathology. *J Immunol*. 2008;180:6297–306.
80. Tumpey TM, Eber VM, Chen SH, Oakes JE, Lusch RN. Interleukin-10 treatment can suppress stromal keratitis induced by herpes simplex virus type 1. *J Immunol*. 1994;153:2258–65.
81. Ivanova EA, Orekhov AN. T helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: an overview. *Biomed Res Int*. 2015;2015:327470.
82. Zhou L, Chang MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30:646–55.
83. Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:271–82.
84. Kouro T, Takatsu K. IL-5 and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol*. 2009;21:303–9.
85. Moon B, Takaki S, Miyake K, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol*. 2004;172:6020–9.
86. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA. Eosinophils in health and disease: the LAR hypothesis. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:563–75.
87. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:62–8.

RESEARCH ARTICLE


Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection

Paula M. Nogueira^{1,2}, Rafael R. Assis¹, Ana C. Torrecilhas³, Elvira M. Saraiva⁴, Natália L. Pessoa¹, Marco A. Campos¹, Eric F. Marialva⁵, Cláudia M. Rios-Velasquez⁶, Felipe A. Pessoa², Náglia F. Secundino¹, Jerônimo N. Rugani¹, Elsa Nieves⁶, Salvatore J. Turco⁷, Maria N. Melo², Rodrigo P. Soares^{1*}

1 Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Parasitologia, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários, Departamento de Ciências Biológicas, UNIFESP, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, Departamento de Imunologia, UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, **7** Department of Biochemistry, University of Kentucky Medical Center, Lexington, Kentucky, United States of America

* rssoares@cpqr.fiocruz.br



 OPEN ACCESS

Citation: Nogueira PM, Assis RR, Torrecilhas AC, Saraiva EM, Pessoa NL, Campos MA, et al. (2016) Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 10(8): e004848. doi:10.1371/journal.pntd.004848

Editor: Alvaro Acosta-Serrano, Liverpool School of Tropical Medicine, UNITED KINGDOM

Received: October 19, 2015

Accepted: June 24, 2016

Published: August 10, 2016

Copyright: © 2016 Nogueira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This manuscript was mainly funded by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Brazil (CNPq PAPE SV1407436/2013-2; 407887/2012-2; 407743/2012; 168260/2014-0; and CNPq PROEP 401975/2012) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, PPM-00163-14); URL: 1) www.cnpq.br; 2) www.fapemig.br. The funders had no role in study design,

Abstract

The immunomodulatory properties of lipophosphoglycans (LPG) from New World species of *Leishmania* have been assessed in *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*, the causative agents of visceral and cutaneous leishmaniasis, respectively. This glycoconjugate is highly polymorphic among species with variation in sugars that branch off the conserved Gal(β1,4)Man(α1)-PO₄ backbone of repeat units. Here, the immunomodulatory activity of LPGs from *Leishmania amazonensis*, the causative agent of diffuse cutaneous leishmaniasis, was evaluated in two strains from Brazil. One strain (PH8) was originally isolated from the sand fly and the other (Josefa) was isolated from a human case. The ability of purified LPGs from both strains was investigated during *in vitro* interaction with peritoneal murine macrophages and CHO cells and *in vivo* infection with *Lutzomyia migonei*. In peritoneal murine macrophages, the LPGs from both strains activated TLR4. Both LPGs equally activate MAPKs and the NF-κB inhibitor p-IκBα, but were not able to translocate NF-κB. *In vivo* experiments with sand flies showed that both strains were able to sustain infection in *L. migonei*. A preliminary biochemical analysis indicates intraspecies variation in the LPG sugar moieties. However, they did not result in different activation profiles of the innate immune system. Also those polymorphisms did not affect infectivity to the sand fly.

data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Leishmania amazonensis, a member of the *Leishmania mexicana* complex, is the causative agent of localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (ADCL) [1,2]. It is widely distributed throughout the Amazon basin, where it infects a wide range of terrestrial rodents and, less frequently, marsupials. Its main vector is *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae) widely distributed in South America and a recent study has predicted its expansion towards South of Brazil [3]. Moreover, *Lutzomyia migonei* (França, 1920) can also harbor the infection of this species [4,5]. Although its transmission to man is very uncommon, *L. amazonensis* triggers an incurable and disseminated form of cutaneous leishmaniasis [2,6]. However, most of the mechanisms involved in *L. amazonensis* pathogenesis are still unknown, especially those related to surface molecules. Glycoconjugates have been extensively characterized as important for the establishment of infection as they protect the parasite from the early action of the host immune system and therefore acting as invasive/evasive strategies. Consequently, we here present the role of lipophosphoglycan (LPG) of *L. amazonensis* in the interaction with vertebrate and invertebrate hosts.

Introduction

The major cell surface glycoconjugate of *Leishmania* is the lipophosphoglycan (LPG), implicated in a wide range of functions, both in vertebrate and invertebrate hosts [7]. In the invertebrate host, LPG variations are important for *Leishmania* specificity to the sand fly [8], where attachment of the parasite to a midgut receptor is a crucial event [9]. In the vertebrate host, the main functions of this virulence factor during the earlier steps of infection include: protect the parasite from complement-mediated lysis, attachment and entry into macrophages [10], able to inhibit phagolysosomal fusion [11], modulation of nitric oxide (NO) production [12] and inhibition of protein kinase C (PKC) [13]. Interestingly, although *L. major* LPG mutants (*lpg* Γ) were highly susceptible to complement mediated lysis, they were able to invade macrophages reinforcing the role of other molecules and the host defenses during the interaction [11].

Many functions have been attributed to *L. amazonensis* LPG including induction of neutrophil extracellular traps (NETs) [14], induction of protein kinase R (PKR) [15], triggering and killing of the parasite via Leukotriene B₄ (LTB₄) [16]. Although *L. amazonensis* LPG is important in many steps of host infection, its role during the interaction with macrophages and sand flies remains unknown.

LPG structures have been described for several dermatotropic and viscerotropic *Leishmania* [17–26]. LPGs have a conserved glycan core region of Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal₄(β 1,3)[Glc(α 1)-PO₄Man(α 1,3)Man(α 1,4)-GlcN(α 1)] linked to a 1-O-alkyl-2-*l*-iso-phosphatidylinositol anchor. The salient feature of LPG is another conserved domain consisting of the Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ backbone of repeat units ($n = 15–30$). The distinguishing feature of LPGs that is responsible for the polymorphisms among *Leishmania* spp. is variable sugar composition and sequence of branching sugars attached to the repeat units and cap structure [27]. For example, the LPG of *Leishmania major* (Friedlin) has β -1,3 galactosyl side-chains, often terminated with arabinose, whereas the LPGs of *Leishmania donovani* (Mongi) and *L. infantum* (PP75 and BH46 strains) possess β -glucoses in their repeat units [17,20,24]. However, there is no available information on the degree of variability in the LPG structure for *L. amazonensis*.

The *L. major* LPG was identified as potent agonist of Toll-like receptor 2 (TLR2) in human natural killer (NK) cells and murine macrophages, triggering the production of TNF- α and

IFN- γ through MyD88 [28,29]. Recently, the LPGs of two New World species (*L. infantum* and *Leishmania braziliensis*) differentially activated TLR2. In this case, *L. braziliensis* LPG was more pro-inflammatory being able to induce the translocation of NF- κ B to the nucleus [30].

As a part of a wider project on the glycobiology of New World species of *Leishmania*, we evaluated the role of *L. amazonensis* LPGs (PH8 and Josefa strains) during the interaction with host cells and the sand fly *L. migonei*. The present study might help to improve our understanding on the immune modulation mediated by glycoconjugates of *L. amazonensis*, the etiological agent of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL).

Materials and Methods

Ethics statement

The animals were kept in the Animal Facility of the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. All animals were handled in strict accordance with animal practice as defined by Internal Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brazil (Protocol P-82/11-4). This protocol followed the guidelines of CONCEA/MCT, the maximum ethics committee of Brazil. Knock-out mice handling protocol was approved by the National Commission of Biosafety (CTNBio) (protocol #01200.006193/2001-16).

Parasites, growth curves, and molecular typing

World Health Organization Reference strains of *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8 and MHOM/BR/75/Josefa) were used. The PH8 strain was originally isolated from the sand fly *L. flaviscutellata* from Pará State, Brazil, and the Josefa strain was isolated from a human case from Bahia State, Brazil. Promastigotes were cultured in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 units/mL, streptomycin 50 μ g/mL, 12.5 mM glutamine, 0.1 M adenine, 0.0005% hemin, and 40 mM Hepes, pH 7.4 at 26°C until late log phase [21]. Parasites were seeded in triplicate (1×10^5 cells/mL), and growth curves of PH8 and Josefa strains were determined daily using a Neubauer improved haemocytometer until cells reached a stationary phase. Both strains exhibited a similar division profile reaching stationary phase after 7 days of culture. For this reason the 6th day was chosen for harvesting parasites for LPG extraction and molecular typing (S1A Fig).

For molecular typing, genomic DNA was extracted from log-phase *Leishmania* using the phenol/chloroform method (1:1) for amplification of the HSP70 fragment prior to digestion with HaeIII as previously described [31]. Positive controls included DNA from *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) and *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). After PCR-RFLP both *L. amazonensis* strains were confirmed (S1B Fig).

Extraction and purification of LPG

For optimal LPG extraction, late log phase cells were harvested and washed twice with PBS prior to extraction of LPGs (Fig 1). The LPG extraction was performed as described elsewhere with solvent E (H₂O/ethanol/diethylether/pyridine/NH₄OH; 15:15:5:1:0.017) after a sequential organic solvent extraction [32]. For purification, the solvent E extract was dried under N₂ evaporation, resuspended in 2 mL of 0.1 M acetic acid/0.1 M NaCl, and applied onto a column with 2 mL of phenyl-Sepharose, equilibrated in the same buffer. The column was washed with 6 mL of 0.1 M acetic acid/0.1 M NaCl, then 1 mL of 0.1 M acetic acid and finally 1 mL of endotoxin free water. The LPGs were eluted with 4 mL of solvent E then dried under N₂ evaporation. LPG

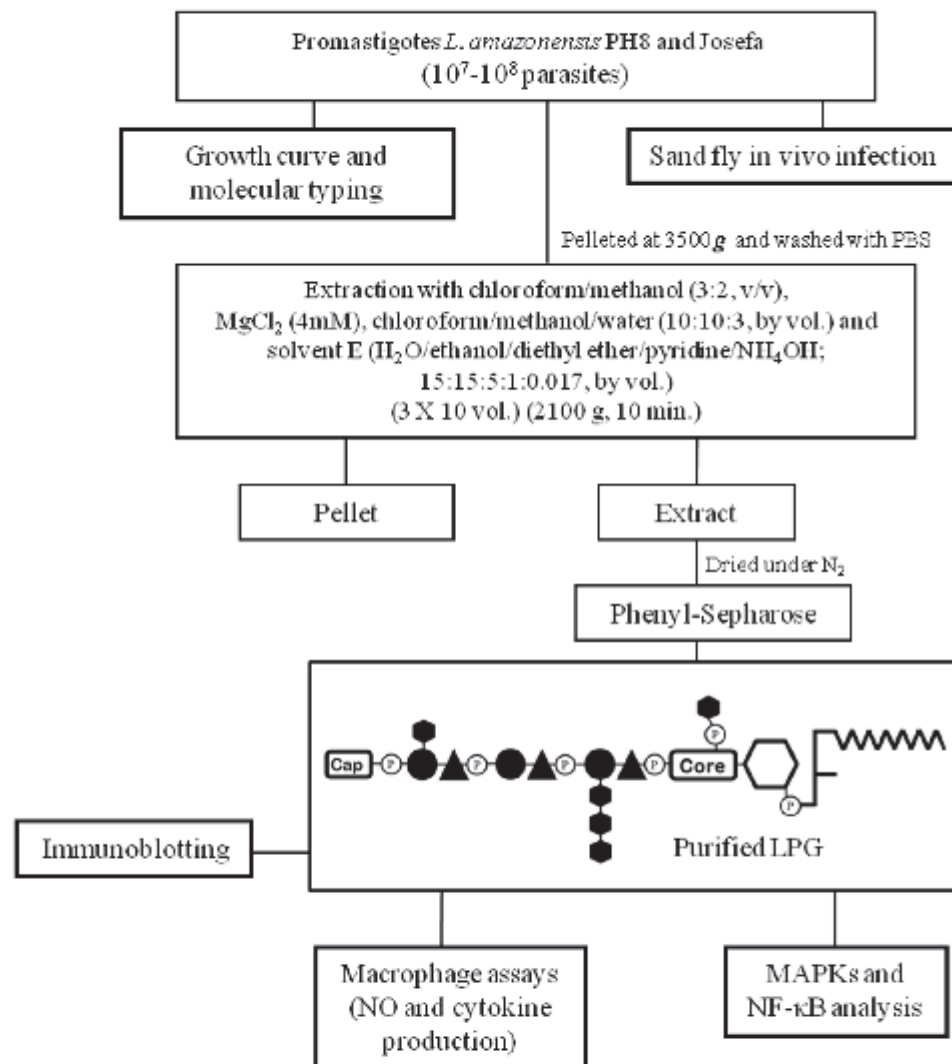


Fig 1. Procedures for extraction, purification, preliminary characterization of *L. amazonensis* LPG, interaction with vertebrate cells and *L. migonei*. Late log phase cells were harvested and washed with PBS. For studies with vector, *L. migonei* midguts were dissected on days 2 and 4 postfeeding containing *L. amazonensis* from each strain. Parasite cell pellets were subject to extraction with organic solvents as described elsewhere. For purification, the solvent E extract was dried under N_2 evaporation and applied into a phenyl-Sepharose column. The purified LPG was used for biological and immunological assays.

doi:10.1371/journal.pntd.0004848.g001

concentrations were determined as described elsewhere [33]. Prior to use on *in vitro* cells cultures, LPGs were diluted in RPMI. All solutions were prepared in sterile, LPS-free distilled water (Sanobiol, Campinas, Brazil). All extractions and purifications procedures are depicted in Fig 1.

Immunoblotting and preliminary characterization of LPGs

Purified LPGs (5 µg) were subjected to dot-blot, blocked (1 h) in 5% milk in PBS and probed for 1 h with monoclonal antibody (mAb) CA7AE (1:1000), that recognizes the unsubstituted Gal(β1,4)Man repeat units [34]; mAb LT22 (1:1000) that recognizes β-glucose side chains and WIC79.3 (1:1000) that recognizes β-galactose side chains [21,35]. After three washes in PBS (5 min), the membrane was incubated for 1 h with anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (1:5,000) and the reaction was visualized using luminol.

Purification of murine peritoneal macrophages and cell culture

Thioglycollate-elicited macrophages were extracted from C57BL/6 and C57BL/6 knockouts TLR2 (-/-) and TLR4 (-/-) by peritoneal washing with ice cold RPMI and enriched by plastic adherence (1 h, 37°C, 5% CO₂). Cells (3 × 10⁵ cells/well) were washed with fresh RPMI then culture in RPMI, 2 mM glutamine, 50 U/mL of penicillin and 50 µg/mL streptomycin supplemented with 10% FBS in 96-well culture plates (37°C, 5% CO₂). Cells were primed with interferon-gamma (IFN-γ) (3 IU/mL) for 18 h prior to incubation with LPGs from both strains (10 µg/mL), live stationary *Leishmania* parasites (MOI 10:1) and lipopolysaccharide (LPS: 100 ng/mL) [30,36].

Cytokine and nitrite measurements

For CBA multiplex cytokine detection, cells were plated, primed as describe above and incubated with LPGs and live stationary promastigotes (MOI 10:1) for 48 h. LPS was added as a positive control and medium as negative control. Supernatants were collected and IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p40 and TNF-α were determined using BD CBA Mouse Cytokine assay kits according to the manufacturer's specifications (BD Biosciences, CA, USA). Flow cytometry measurements were performed on a FACSCalibur flow cytometry (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). Cell-Quest™ software package provided by the manufacturer was used for data acquisition and the FlowJo software 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) was used for data analysis. A total 1,500 events were acquired for each preparation. Results are representative of six experiments in duplicate. Nitrite concentrations were determinate by Griess reaction (Griess Reagent System, 2009).

MAPKs and NF-κB translocation assay

For MAPKs, peritoneal murine macrophages were obtained as described above. They were applied on 24 wells tissue culture plates (10⁶ cells/well) for 18 h prior to assay. The cells were washed with warm RPMI and incubated with LPG from both species for different times (5, 15, 30, 45 and 60 min) or with medium (negative control) or *E. coli* extracts (100 ng/mL, only 45 minutes) as positive control. p-p38, p-JNK, p-IκBα and total p38 were assayed as previously described [25]. p-IκBα antibody was provided by Dr. L. P. de Sousa. NF-κB translocation using CHO reporter lines (a kind gift by M. A. Campos) was determined as described elsewhere [30]. CHO reporter cells were plated (1 × 10⁵ cells/well) in 24-well tissue culture dishes and the LPG (0.02 and 0.2 µg/mL) from both strains was added in a total volume of 0.25 mL medium/well.

The cells were examined by flow cytometry (BD Biosciences, CA, USA) and the analyses were performed using CellQuest™ software.

Sand fly *in vivo* infection

Lutzomyia migonei (Baturite strain) sand flies were kept under laboratory conditions and were fed on 30% sucrose solution for 3–4 days prior to experiments. The insects were artificially fed using a chick skin membrane in a glass-feeder device. The chick skin membrane was provided by the Animal Facility of Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ under the Protocol LW 30/10. Heparinized mouse blood (drawn intracardially from Balb/C), with penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (37°C) containing 2×10^7 /mL logarithmic phase promastigotes (PH8 and Josefa strains) offered for 5 h under dark conditions [5]. Blood engorged flies were separated and maintained at 26°C with 30% sucrose. Engorged sand flies had their midguts dissected on days 2 and 4 post feeding. The midguts were homogenized in 30 µl of PBS and the number of viable promastigotes determined by counting under a Neubauer improved haemocytometer [24].

Statistical analyses

For nitrite, cytokine measurements and *in vivo* sand fly experiments, the Shapiro Wilk test was conducted to test the null hypothesis that data were sampled from a Gaussian distribution [37]. For the non-parametric distribution, it was performed the Mann-Whitney test. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software (Graph Prism Inc., San Diego, Ca). $P < 0.05$ was considered significant.

Results

The LPGs from *L. amazonensis* strains display intraspecific polymorphism

The purified LPGs from *L. amazonensis* PH8 and Josefa strains were differentially recognized by the mAbs CA7AE and LT22 (S2 Fig). LPG from PH8 strain was recognized by CA7AE and LT22 as well as the positive control represented by *L. infantum* (BH46). However, a different recognition profile was observed for the Josefa strain since its LPG was weakly recognized by LT22 but not by CA7AE, indicating the presence of side-chains branching-off the repeat units. Because CA7AE recognizes Gal(β1,4)Man unsubstituted repeat units in LPG [34], these results indicate that at least some of the repeat units are indeed unsubstituted in the LPG of PH8 strain. On the other hand, the presence of side-chains suggestive of glucoses, due to LT22 reactivity, was detected in the LPGs of PH8 and Josefa strains. However, LT22 also recognized the galactose-branched repeat units of *L. major* (strains FV1 and LV39) indicating cross-reactivity of the antibodies, thus suggesting the presence of either glucose or galactose as side chains (S2 Fig). These data suggested an intraspecific polymorphism in the LPGs of *L. amazonensis* strains.

LPGs from *L. amazonensis* strains equally activate NO and cytokine production via TLR4

We investigated whether LPGs purified from different strains could have an impact on the parasite's interaction with host cells, the ability to elicit NO and cytokine production by murine macrophages. LPGs from both strains were incubated with murine peritoneal macrophages from C57BL/6 and respective knockouts for TLR2 (-/-) and TLR4 (-/-). We did not detect any production of the cytokines IL-1β, IL-10 and IL-12 (S3A–S3C Fig). Both LPGs and respective

parasites were able to activate through TLR4, resulting in NO, TNF- α and IL-6 production (Fig 2A–2C) ($P < 0.05$). As expected, LPS (positive control) activated TLR4 in the TLR2 (-/-) (Fig 2A–2C).

LPGs from *L. amazonensis* equally activate MAPKs and the NF- κ B inhibitor p-I κ B α via TLR4

No difference in MAPKs phosphorylation (p38 and JNK) and p-I κ B α was observed after incubation with LPGs from both strains. In peritoneal murine macrophages this activation was mainly via TLR4 (Fig 3A and 3B). We also evaluated if the LPGs from these strains were able to translocate NF- κ B in CHO cells. No activation of NF- κ B was detected in those cells (Fig 4).

Leishmania amazonensis strains equally infected the sand fly *L. migonei*

In vivo midgut infections of the sand flies were determined on days 2 and 4 post feeding, in order to evaluate the number of parasites after the blood meal digestion, as well as, after its excretion on day 3, where non-attached parasites are lost. Although a higher parasite density was detected for PH8 strain on day 2 ($P < 0.05$), no statistical differences in the parasite densities from both *L. amazonensis* strains were observed on day 4, and both strains were able to colonize *L. migonei* midgut ($P > 0.05$, Fig 5).

Discussion

Leishmania amazonensis, etiologic agent of the cutaneous and anergic diffuse leishmaniasis, is characterized by disseminated non-ulcerative skin lesions and constantly proportion of negative delayed hypersensitivity skin-test (DTH), resulting in a high resistance of this disease to any type of chemotherapy [1,38,39]. In the Old and New World, parasite glycoconjugates have been implicated in a variety of events during parasite-host interactions [40,41]. More recently, the role of LPG and GIPLs in the *L. braziliensis* and *L. infantum* was determined, suggesting that two distinct LPGs were able to differentially modulate macrophage functions [30,41]. Regarding *L. mexicana* complex, from where *L. amazonensis* is a member, a recently study has demonstrated the inflammatory role of LPG [42]. This glycoconjugate naturally exposed to the host immune system could contribute to the maintenance of infection by interfering with the assembly immune response, like modulation of cytokine production and non-activation of effectors cells. In the present work, we investigated whether LPGs from two *L. amazonensis* strains would account for differences in the interaction with macrophages and *L. migonei*.

LPG polymorphisms are common in the composition of branching sugars attached to the conserved repeat units of its backbone. While in the Old World species, a wide spectrum of sugar composition and structure is commonly observed, in New World species only glucose residues in the side chains of *Leishmania* were documented to date [17,21,23,24,43]. Our preliminary characterization of the repeat units using specific antibodies suggested the existence of intraspecies polymorphism in *L. amazonensis* LPGs with differences in the side-chains and in the level of glycosylation. The LPG of PH8 strain strongly reacted with CA7AE, that recognizes the basic backbone of the repeat units is Gal(β)Man-PO₄ [21,34]. However, Josefa LPG did not react with this antibody, thus suggesting the existence of sugars as side-chains in the repeat units. This feature is commonly found in the LPG of *L. major* reference strain FV1, which does not react with CA7AE [17]. In order to evaluate the quality of the sugars branching-off the repeat units, LT22 and WIC.79.3 antibodies were used to detect the presence of glucose and galactose, respectively [21,35]. Based on *L. major* LPGs used as controls, they were either recognized by those antibodies, suggesting cross-reactivity. Moreover, those data

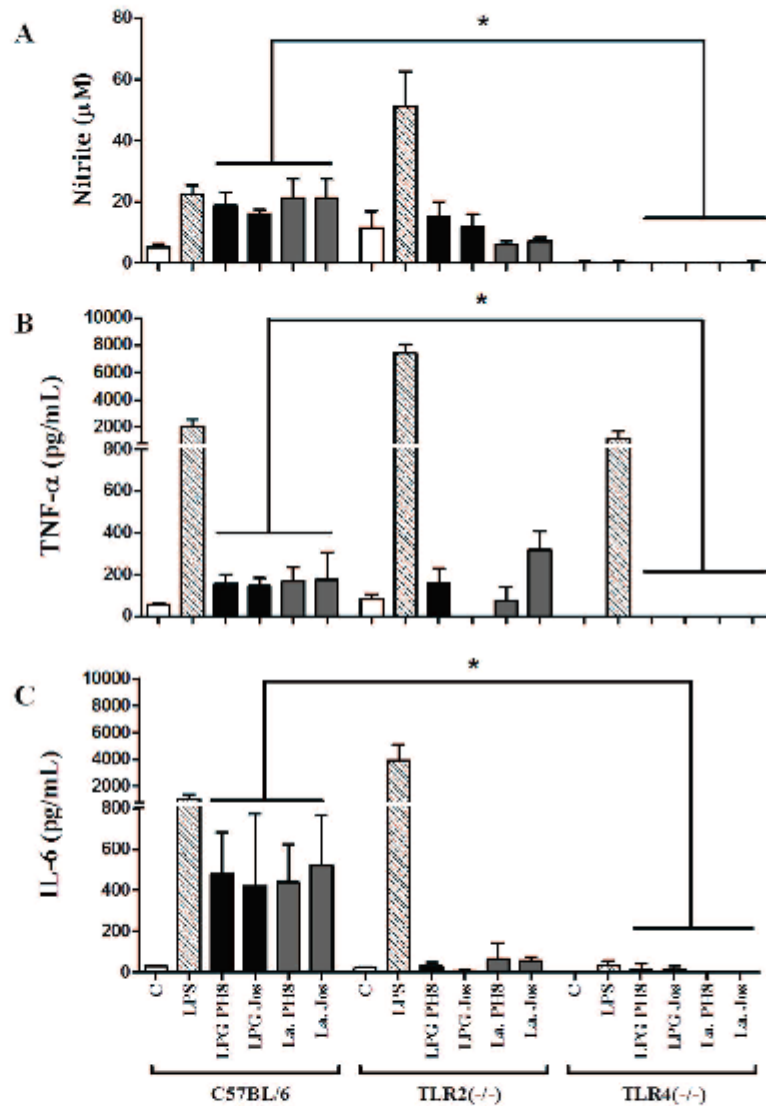


Fig 2. Nitrite (A) and cytokines TNF- α (B) and IL-6 (C) production by IFN- γ primed macrophages stimulated with LPG and live parasites. Cells were pre-incubated with IFN- γ (3 IU/mL) for the 18 h then 10 μ g/mL of LPG, and supernatants used for cytokine and nitrite measurements were collected 48 h later. Fresh medium alone was used as negative control cells and LPS (100 ng/mL) as a positive control. Nitrite concentration was measured by Griess reaction and cytokine concentrations were determined by flow cytometry. C = negative control; LPG PH8 = *L. amazonensis* LPG PH8 strain; LPG Jos = *L. amazonensis* LPG Josela strain; La PH8 = *L. amazonensis* PH8 live

promastigotes and La Jos = *L. amazonensis* Josefa live promastigotes. Results represent the mean \pm SD of 6 experiments in duplicate, * = $P < 0.05$ was considered significant.

doi:10.1371/journal.pntd.0004848.g002

reinforced the presence of either glucoses or galactoses as side-chains in *L. amazonensis* LPGs. A fully detailed biochemical analysis must await the results of further investigations.

Understanding variations and the LPG structures are crucial for the comprehension of the mechanisms of how parasites survive under extremely adverse conditions. Although the role of LPG in the interaction with the vertebrate host immune system has been studied, it is still unclear how its polymorphism affects the parasite survival. *L. amazonensis* LPG induces release of NETs and LTB4 production by neutrophils, thus contributing to diminish parasite burden in the *Leishmania* inoculation site [14,16]. Additionally, *L. mexicana* LPG induce TNF- α and IL-10 in monocytes, modulates IL-12 production and diminishes NF- κ B nuclear translocation

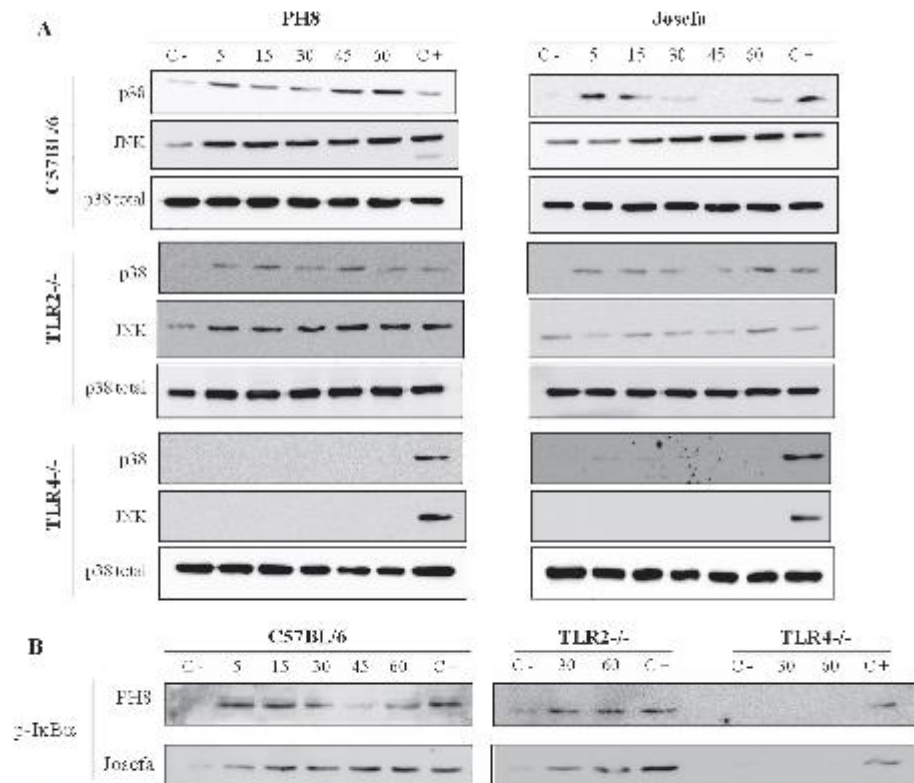


Fig 3. Activation of p38/JNK (A) and p-I κ B α (B) in peritoneal murine macrophages (C57BL/6, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-}) by *L. amazonensis* LPGs (PH8 and Josefa). Macrophages were stimulated for 5, 15, 30, 45 and 60 min with 10 μ g/mL of LPG from *L. amazonensis* PH8 and Josefa strains. Dually phosphorylated MAPKs (p38 and JNK) and p-I κ B α were detected by Western blot analysis. C- = negative control; C+ = *E. coli* extract, positive control (100 ng/mL, 45 min). Total p38 content was used as the normalizing protein.

doi:10.1371/journal.pntd.0004848.g003

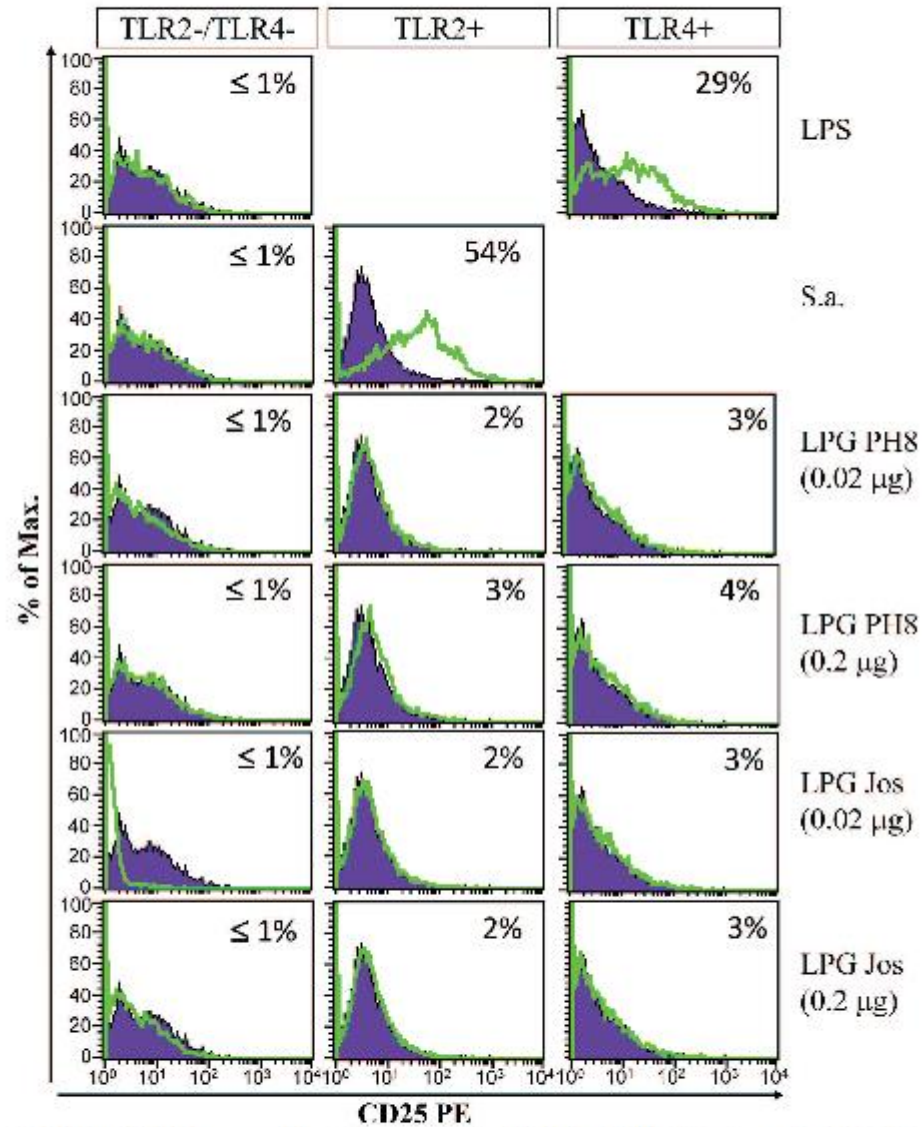


Fig 4. LPGs purified of *L. amazonensis* do not induce translocation of NF- κ B through TLRs. CHO cells expressing TLR2 (TLR2+), TLR4 (TLR4+), or neither (TLR2-/TLR4-) were either untreated (purple line) or treated (green line) with LPGs from both strains of *L. amazonensis*. Legend: PH8 and Josefa LPGs (0.2 and 0.02 μ g). Controls: LPS (TLR4 control) and *S. aureus* (S.a.) (TLR2 control). CD25 expression was measured by flow cytometry 18 h after stimulation. Results shown as percentage of CD25 expression on stimulated cells minus percentage of CD25 expression on non-stimulated cells.

doi:10.1371/journal.pntd.0004848.g004

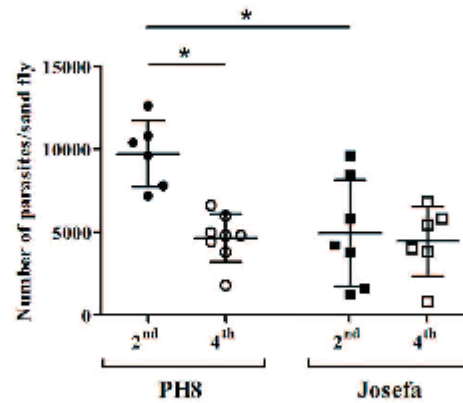


Fig 5. Development of *L. amazonensis* (PHS and Josefa strains) in *Lutzomyia migonei*. Sand flies were infected with promastigotes (2×10^7 parasites/mL) of PHS and Josefa strains. Day 2 (2nd) parasites counted before blood excretion; Day 4 (4th) parasites remaining after blood excretion. Results are representative of two experiments and * = $P < 0.05$ was considered significant.

doi:10.1371/journal.pntd.0004848.g005

[44]. Here we show that LPGs from both *L. amazonensis* strains stimulates NO and cytokine production (TNF- α and IL-6) by peritoneal murine macrophages via TLR4. A similar cytokine production was also observed for other species such as *L. braziliensis* LPG, another important dermatotropic species. However, this activation was primarily via TLR2 [30]. The NO production by macrophages play a central role in determining intracellular killing of *Leishmania* [45] and the intact structure of LPG appears to be important for this activation [12,29]. In many models, NO synthesis is dependent on a combination of IFN- γ and TNF- α via TLR-dependent mechanisms as an important leishmanicidal effector complex to macrophages [46]. In conclusion, the preliminary variations in the sugar motifs of LPG, did not result in any difference in macrophage activation/signaling thus suggesting the role of conserved motifs such as the lipid anchor [29].

Previous studies have demonstrated that different macrophage receptors mediate the uptake and phagocytosis of *Leishmania*. The early recognition of pathogens by cells capable of synthesizing cytokines is crucial for the adequate control of intracellular pathogens. Gene knockout studies in mice have suggested that TLR signaling is essential for the immune response against *Leishmania* parasites. Moreover, *Leishmania* LPGs and GPIs are agonists of TLR2 and TLR4 [28–30,41,42]. Glyconjugates can modulate the host immune response and their activity seems to be structure dependent. The *L. braziliensis* LPG exerts a pro-inflammatory interaction with TLR2, inducing the production of NO and cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6). On the other hand, the *L. infantum* LPG was shown to be immunosuppressive and did not induce NO, cytokines and NF- κ B translocation [30]. Our results indicate that LPG from both *L. amazonensis* strains induce the production of NO and cytokines in IFN- γ -primed macrophages via TLR4. However in other members of the *L. mexicana* complex, *L. mexicana* LPG activates either TLR2 or TLR4 leading to ERK and p38 MAPK phosphorylation and production of cytokines in human macrophages [42].

Thus, although it has been shown that LPG of *Leishmania* activates TLRs and that the engagement of these receptors is important for the infection, the complete intracellular

processes that are involved in this activation remain unknown. Here we bring some light into the effects of LPG on MAPK and NF- κ B signaling, a kinase and transcription factor known for their crucial role in immune defense against pathogens [44,47–49]. According to previous reports, infection by *L. amazonensis* altered phosphorylation of ERK1/2 in response to LPS in murine macrophages [50] and also activates a transcriptional repressor of the NF- κ B [48,51]. Consistent with those observations, here LPGs from both *L. amazonensis* strains also activated p-I κ B α , a NF- κ B translocation inhibitor, via TLR4. Since no further NF- κ B translocation was detected in the CHO cells, a possible mechanism that has been suggested favors its inhibition by p50/p50 NF- κ B homodimer [55]. Moreover, *L. donovani* and *L. major* infection caused inactivation of ERK1/2 and p38, respectively, which was accompanied by the inhibition of transcription factors also modulation of cytokine production [52,53]. In contrast to GPIs (with fail to activate MAPKs) [41], our data show that LPG from both *L. amazonensis* strains is equally activating MAPKs (p38 and JNK) and p-I κ B α in peritoneal murine macrophages via TLR4 (Fig 3). On the other hand, these LPGs do not activate the NF- κ B translocation. These and our results strongly suggest that *Leishmania* species have distinct mechanism of modulating the signaling pathways during immunopathological events.

The role of LPG during the interaction with the invertebrate host is a very controversial subject and it has been extensively investigated using *in vitro* and *in vivo* models [8,21,24,54,55]. Although the *in vitro* system has limitations [56], this model provided important evidence for parasite attachment in the sand fly midgut using many restricted and specific vector as classified elsewhere [57,58]. For example, successful binding to the midgut was reported using the Old World pairs *L. major/Phlebotomus papatasi* [8,54], *L. major/Phlebotomus duboscqi* [59] and *L. tropica/Phlebotomus sergenti* [60]. Perhaps, due its similarity to *L. major* LPG, who also possesses terminal β -galactosyl residues, *L. turanica* LPG may also be important for development in *P. papatasi* [61,62]. Moreover, the role of LPG has been questioned in permissive vectors such as *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus perniciosus*, where LPG mutants of *L. mexicana* and *L. major* were able to sustain infection in those vectors [63]. Recently, an alternative mechanism was suggested that flagellar protein FLAG1/SMP1 has been also implicated as an attachment binding candidate for specific and restricted vectors. In this work, a competitive binding assays using an antibody against FLAG1/SMP1 inhibited interaction using the pair *L. major* and *P. papatasi*. However, no effect was observed for permissive *L. longipalpis* [64].

The significance of LPG modifications was investigated during *in vivo* interaction of *L. amazonensis* with *L. migonei*. Although *L. amazonensis* is naturally transmitted by *L. flaviscutellata*, the absence of a colony led us to use an alternative sand fly, which had been previously shown to successfully harbor this parasite and *L. braziliensis* [5]. Since this species, although suspected, is not yet considered a natural proven vector of *L. amazonensis*, a high parasite doses was artificially offered to the sand flies. In spite of a loss after the 3rd day, parasite multiplication inside the alimentary tract of the *L. migonei* was successful for both *L. amazonensis* strains. To survive, the parasites need a void a number of barriers including the lethal effects of digestive enzymes in the early blood-fed midgut and the excretion with the digested blood meal [5,7,65,66]. The strong correlation between the excretion of blood meal and the sudden loss of promastigotes suggests that the inability of *Leishmania* strains to persist in an inappropriate sand fly is related to their failure to remain anchored to the gut wall via specific attachment sites [22,67]. Nevertheless, *L. migonei* was able to sustain infection with both of the *L. amazonensis* strains tested, regardless of the type of LPG. It seems likely that *L. migonei* together with *L. longipalpis* might be considered a permissive vector as previously suggested [57,58,68]. However, the fully development of those two *L. amazonensis* strains should be further investigated.

Some studies have determined that polymorphisms in the phosphoglycan domains of LPG might be crucial for *Leishmania* promastigotes to attach to the midgut and to maintain vector

infection after blood meal excretion [9]. Additional support is based on the altered behavior of LPG deficient *L. donovani* and *L. major* mutant promastigotes (lpg⁻) who showed diminished capacity to maintain infection within the sand fly midgut [54,69]. Furthermore, it was recently presented the occurrence of intraspecies polymorphism in *L. infantum* LPG. Also, the biological role of the three LPG types (I, II and III) was studied during the interaction with the vector *L. longipalpis* [24]. Consistent with our results, all strains could successfully sustain infection in this vector, indicating that LPG polymorphisms did not affect this process. In spite of having a strong evidence for the existence of a midgut receptor for LPG, there is no current information in *L. migonei*. Indeed, the only known receptor was described for *L. major*, a galectin receptor found in the midgut of *P. papatasi* binding to LPG β -galactose residues [9,70]. The existence of midgut glycoproteins bearing terminal N-acetylgalactosamine in sand fly was also suggested as a putative parasite ligand [71].

Here we describe for the first time the immunomodulatory properties of two LPGs isolated from different hosts. Those LPGs were equally able to trigger NO and cytokine (TNF- α and IL-6) production via TLR4. The preliminary differences in carbohydrate structure did not seem to affect the interaction of these strains with macrophages and the sand fly vector.

Supporting Information

S1 Fig. Growth curves of *L. amazonensis*. (A) *L. amazonensis* (PH8 and Josefa strains) were grown in M199 medium and counts determined daily (initial concentration of 1×10^5 /mL). (B) Restriction fragment length polymorphisms of 120 bp kDNA amplicons from *Leishmania* obtained with restriction enzyme Hae III and analyzed on silver-stained 10% polyacrylamide gel. MM: 50 bp molecular size marker; lanes: Lb-*L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li-*L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); La-*L. amazonensis* reference (IFLA/BR/67/PH8), PH8 -*L. amazonensis* PH8 (IFLA/BR/67/PH8) and Jos-*L. amazonensis* Josefa (MHOM/BR/75/Josefa). (TIF)

S2 Fig. Dot-blot of *Leishmania* LPGs using different mAb antibodies. Purified LPGs from *L. amazonensis* strains (PH8 and Josefa), *L. infantum* (BH46 strain) and *L. major* strains (FV1 and LV39) were probed with the mAbs CA7AE (1:1000), LT22 (1:1000) and WIC 79.3 (1:1000). Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:5000) was used as secondary antibody. The reaction was developed with luminol. (TIF)

S3 Fig. Cytokine production by IFN- γ primed macrophages stimulated with LPG and live parasites. Cells were pre-incubated with IFN- γ (3 IU/mL) for the 18 h then 10 μ g/mL of LPG, and supernatants used for cytokine IL-10 (A), IL-1 β (B) and IL-12 (C) measurements were collected 48 h latter. Fresh medium alone was used as negative control cells and LPS (100 ng/mL) as a positive control. Cytokine concentrations were determined by flow cytometry. C = negative control; LPG PH8 = *L. amazonensis* LPG PH8 strain; LPG Jos = *L. amazonensis* LPG Josefa strain; La PH8 = *L. amazonensis* PH8 live promastigotes and La Jos = *L. amazonensis* Josefa live promastigotes. Results represent the mean \pm SD of 3 experiments in duplicate, * = $P < 0.05$ was considered significant. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RPS SJT ACT MNM RRA MAC EMS.

Performed the experiments: RPS PMN RRA JNR NLP NFS EFM CMRV FAP EN ACT.

Analyzed the data: RPS PMN RRA ACT NFS MNM.

Contributed reagents/materials/analysis tools: RPS SJT MNM MAC ACT EN NFS FAP CMRV.

Wrote the paper: RPS PMN RRA MNM SJT.

References

1. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999; 354: 1191–1199. PMID: [10513726](#)
2. Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009; 31: 423–431. doi: [10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x](#) PMID: [19648206](#)
3. Carvalho BM, Rangel EF, Ready PD, Vale MM. Ecological Niche Modelling Predicts Southward Expansion of *Lutzomyia (Myssomyia) flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Vector of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in South America, under Climate Change. *PLoS ONE*. 2015; 10(11).
4. Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989. pp. 687–725. PMID: [2701633](#)
5. Neves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Mannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). 2000; 37: 134–140.
6. Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1988; 321: 389–404. PMID: [2907150](#)
7. De Assis RR, Ibrahim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2012; 1820: 1354–1365.
8. Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garsway La, Beverley SM, et al. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 9155–9159. PMID: [8090785](#)
9. Kanhawi S, Ramalho-Ortigueo M, Van MP, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al. A role for insect galactins in parasite survival. *Cell*. 2004; 119: 329–341. PMID: [15543683](#)
10. Bitttingham A, Mosser D. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*. 1996; 12: 444–447. PMID: [15276279](#)
11. Spith GF, Garsway La, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 9536–9541. PMID: [12869694](#)
12. Proudfoot L, Nikolaev A, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson Ma, Brimacombe JS, et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 10984–10989. PMID: [8865236](#)
13. Giorgione JR, Turco SJ, Epanand RM. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 11634–11639. PMID: [8876188](#)
14. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 6748–6753. doi: [10.1073/pnas.090026106](#) PMID: [19346483](#)
15. de Carvalho Vivarini A., Pereira FDMS, Dias Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB J*. 2011; 25: 4162–4173. doi: [10.1096/fj.11.185165](#) PMID: [21846836](#)
16. Tavares NM, Araújo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al. Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vivo: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. *J Infect Dis*. 2014; 210: 1–11.
17. McConville MJ, Turco SJ, Ferguson Ma, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J*. 1992; 11: 3593–3600. PMID: [1396559](#)
18. McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J*. 1995; 310: 807–818. PMID: [7575413](#)

19. Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1995; 181: 685–697. PMID: [7836922](#)
20. Mahoney AB, Sacks DL, Sattiva E, Modi G, Turco SJ. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*—Sand fly interactions. *Biochemistry*. 1999; 38: 9813–9823. PMID: [10433687](#)
21. Soares RPP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, et al. *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; 121: 213–224. PMID: [12034455](#)
22. Soares RPP, Barron T, McCoy-Simandle K, Svobodova M, Waubug A, Turco SJ. *Leishmania tropica*: Intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp Parasitol*. 2004; 107: 105–114. PMID: [15208044](#)
23. Soares RPP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MSS, Pimenta RPP, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: A novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol*. 2005; 35: 245–253. PMID: [15722076](#)
24. Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, et al. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol Australian Society for Parasitology Inc.*; 2011; 41: 333–342.
25. Passaia L, de Assis R, Nogueira P, Torrecilhas A, Campos J, Silveira A, et al. *Leishmania enfettit*: biochemical characterization of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 31. doi: [10.1186/s13071-015-0633-8](#) PMID: [25696203](#)
26. Passero LFD, Assis RR, da Silva TNF, Nogueira PM, Macedo DH, Pessoa NL, et al. Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania (Manni) shawi*. *Parasitol Int. Elsevier Ireland Ltd*; 2015; 64: 32–35.
27. Turco SJ, Descoeteaux A. The Lipophosphoglycan of *Leishmania* Parasites. 1992; 65–94.
28. Becker I, Salazar N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Camascos N, Kobeh LG, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 130: 65–74. PMID: [12946842](#)
29. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato J a., Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 2822–2831. PMID: [14515266](#)
30. Ibrahim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 54. doi: [10.1186/1756-3305-6-54](#) PMID: [23497381](#)
31. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Aysa J, et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2294–2297. PMID: [15131217](#)
32. Orlandi PA, Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*. 1987; 262: 10384–10391. PMID: [3611065](#)
33. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JKJ, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956; 28: 350–356.
34. Tolson DL, Turco SJ, Beecroft RP, Pearson TW. The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol*. 1989; 35: 109–118. PMID: [2475775](#)
35. Kelleher M, Curtis JM, Sacks DL, Handman E, Bacio A. Epitope mapping of monoclonal antibodies directed against lipophosphoglycan of *Leishmania major* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 68: 187–200. PMID: [7808469](#)
36. Kolodziej H, Radtke O a., Kiderlen AF. Stimulus (polyphenol, IFN- γ , LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 264.7 macrophages. *Phytochemistry*. Elsevier Ltd; 2008; 69: 3103–3110.
37. Shapiro SS. *JSTOR: Biometrika*, Vol. 52, No. 3/4 (Dec., 1965), pp. 591–611. *Biometrika*. 1965;
38. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27: 305–318. PMID: [15225981](#)
39. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 525–534. PMID: [16184231](#)

40. Sacks D, Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. 2001;
41. Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glyco inositol phospholipids from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*: Modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: 1–11.
42. Rojas-Bernabé A, Garcia-Hernández O, Maldonado-Bernal C, Delgado-Domínguez J, Ortega E, Gutiérrez-Kobeh L, et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology*. 2014; 141: 788–800. doi: [10.1017/S0031182013002187](https://doi.org/10.1017/S0031182013002187) PMID: [24612642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24612642/)
43. Iig T, Elgers R, Overath P, Mccoonvilleq MJ, Thomas-ostest J, Thomasl J, et al. Structure of *Leishmania mexicana* Lipophosphoglycan. 1992;
44. Argueta-Donohué J, Carillo N, Valdés-Reyes L, Zentella A, Aguirre-García M, Becker I, et al. *Leishmania mexicana*: Participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp Parasitol*. 2008; 120: 1–9. doi: [10.1016/j.exppara.2008.04.002](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.002) PMID: [18508052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18508052/)
45. Holzmüller P, Bras-Gonçalves R, Lemeire J-L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*. 2006; 132 Suppl: S19–S32. PMID: [17018162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17018162/)
46. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 958–969. doi: [10.1038/nri2448](https://doi.org/10.1038/nri2448) PMID: [19029990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029990/)
47. Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- κ B signaling pathway. *J Immunol*. 2004; 173: 3297–3304. PMID: [15322192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322192/)
48. Calegari-Silva TC, Pereira RMS, De-Melo LDB, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, et al. NF- κ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett*. 2009; 127: 19–26. doi: [10.1016/j.imlet.2009.08.009](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.08.009) PMID: [19712696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19712696/)
49. Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol*. 2007; 178: 1077–1085. PMID: [17202371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17202371/)
50. Marfány A, Meyer-Fernandes JR, De Souza W, Vannier-Santos MA. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1999; 102: 1–12. PMID: [10477171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10477171/)
51. Calegari-silva TC, Vivatari C, Miqueline M, Dos Santos GRFM, Teixeira KL, Saliba AM, et al. The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF- κ B p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway. *Open Biol*. 2015; 5.
52. Sivastava A, Singh N, Mishra M, Kumar V, Gour JK, Bajpai S, et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. *Mol Cell Biochem*. 2012; 359: 359–368. doi: [10.1007/s11010-011-1029-6](https://doi.org/10.1007/s11010-011-1029-6) PMID: [21898498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21898498/)
53. Sackar A, Aga E, Busameyer U, Bhattacharyya A, Müller S, Hellberg L, et al. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Med Microbiol Immunol*. 2013; 202: 25–35. doi: [10.1007/s00430-012-0246-1](https://doi.org/10.1007/s00430-012-0246-1) PMID: [22861217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22861217/)
54. Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sand fly midgut. *Science*. 1992; 256: 1812–1815. PMID: [1615326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1615326/)
55. Soares RP, Margonari C, Secundino NC, Macêdo ME, Da Costa SM, Rangel EF, et al. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010. doi: [10.1155/2010/438174](https://doi.org/10.1155/2010/438174)
56. Wilson R, Bates MD, Dostalova A, Jecna L, Dillon RJ, Volff P, et al. Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Competitive Binding Assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e816. doi: [10.1371/journal.pntd.000816](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000816) PMID: [20838647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20838647/)
57. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006; 22: 439–445. PMID: [16943727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16943727/)
58. Volff P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*. 2007; 23: 91–92. PMID: [17207683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17207683/)
59. Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley SM, Volff P. *Leishmania major* glycoylation mutants require phosphoglycans (pg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: 1–7.

60. Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PF, Rowton E, Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*. 2000; 121 (Pt1): 25–33. PMID: [11085222](#)
61. Chajbulinova A, Votypka J, Sadiova J, Kvapilova K, Seblova V, Kreisinger J, et al. The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. *Parasit Vectors*. Parasites & Vectors; 2012; 5: 219. doi: [10.1186/1756-3305-5-219](#) PMID: [23031344](#)
62. Volf P, Nogueira PM, Myskova J, Turco SJ, Soares RP. Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol Int*. Elsevier Ireland Ltd; 2014; 63: 683–686.
63. Jecna L, Dostalova A, Wilson R, Seblova V, Chang K-P, Bates P a, et al. The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. *Parasitology*. 2013; 140: 1026–32. doi: [10.1017/S0031182013000368](#) PMID: [23611086](#)
64. Di-Biasi T, Lobo AR, Nascimento LM, Córdova-Rojas JL, Pestana K, Marin-Villa M, et al. The Flagellar Protein FLAG1/SMP1 is a Candidate for *Leishmania*–Sand Fly Interaction. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2015; 15: 202–209. doi: [10.1089/vbz.2014.1736](#) PMID: [25793476](#)
65. Sacks DL. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*. 2001; 3: 189–196. PMID: [11288643](#)
66. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 276. doi: [10.1186/1756-3305-5-276](#) PMID: [23206339](#)
67. Soares RP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc*. 2003; 75: 301–330. PMID: [12947480](#)
68. Guimarães VCPV, Pruzinova K, Sadiova J, Volfova V, Myskova J, Filho SPB, et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*. Parasites & Vectors; 2016; 9: 159. doi: [10.1186/s13071-016-1444-2](#) PMID: [26988559](#)
69. Butcher BA, Turco SJ, Hilly BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL. Deficiency in b1, 3-Galactosyltransferase of a *Leishmania major* Lipophosphoglycan Mutant Adversely Influences the *Leishmania*–Sand Fly Interaction. 1996; 271: 20573–20579.
70. Dillon RJ, Lane RP. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sand-fly vector. 1999; 27: 32.
71. Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect*. 2007; 9: 317–324. PMID: [17307009](#)