

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Microbiologia**  
**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

**Natália Lima Pessoa**

**O PAPEL DE RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRS) NA RESPOSTA ÀS  
INFECÇÕES POR ZIKA VIRUS, DENGUE VIRUS E SARS-COV-2**

Belo Horizonte

2022

Natália Lima Pessoa

**O PAPEL DE RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRS) NA RESPOSTA ÀS  
INFECÇÕES POR ZIKA VIRUS, DENGUE VIRUS E SARS-COV-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

ORIENTADOR: Dr. Marco Antônio Campos (IRR/FIOCRUZ)

COORIENTADOR: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon (ICB/UFMG)

Belo Horizonte

2022

043

Pessoa, Natália Lima.

O papel de receptores do Tipo Toll (TLRS) na resposta às infecções por Zika virus, Dengue virus e SARS-COV-2 [manuscrito] / Natália Lima Pessoa. – 2022. 217 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Marco Antônio Campos. Coorientador: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Sistema Imunitário. 3. Receptores Toll-Like. 4. Zika vírus. 5. Vírus da Dengue. 6. Betacoronavirus. 7. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. I. Campos, Marco Antônio da Silva. II. Kroon, Erna Geessien. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE NATÁLIA LIMA PESSOA

Nº REGISTRO: 2017711742

Às 09:00 horas do dia **26 de maio de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Érica Azevedo Costa (Medicina Veterinária Preventiva/Escola de Veterinária/UFMG), Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (Medicina Veterinária Preventiva/Escola de Veterinária/UFMG), Jaqueline Maria Siqueira Ferreira (Universidade Federal de São João Del Rey (UFSJ), Danilo Bretas de Oliveira (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos (Orientador) e a Profa. Dra. Erna Geessien Kroon (Coorientadora), para julgar o trabalho final **“O papel de receptores do tipo Toll (TLRs) na resposta às infecções por Zika virus, dengue virus e SARS-CoV-2”** da aluna **Natália Lima Pessoa**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

#### Membros da Banca:

Profa. Dra. Érica Azevedo Costa

Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Profa. Dra. Jaqueline Maria Siqueira Ferreira

Dr. Danilo Bretas de Oliveira

#### De acordo:

Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos

(Orientador)

Erna Geessien Kroon  
(Coorientadora)

Profa. Daniela da Glória de Souza  
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antônio da Silva Campos, Usuário Externo**, em 27/05/2022, às 09:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/05/2022, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 30/05/2022, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa, Professora do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 14:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Bretas de Oliveira, Usuário Externo**, em 30/05/2022, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaqueline Maria Siqueira Ferreira, Usuário Externo**, em 30/05/2022, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1450166** e o código CRC **DE47624C**.

Dedico este trabalho à minha avó,  
meu maior exemplo de força e resiliência,  
que nunca perdeu a ternura.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo apoio e amor que eu sempre recebi. Sem eles eu não conseguiria, são a minha estrutura, meu alicerce, o que me mantém forte, são tudo para mim. À vovó Maildes, por todo apoio e carinho.

À vovó Marlene, que foi meu maior exemplo de amor incondicional, carinho, força, esperança e fé. O que ela representa para mim, o amor e a saudade que eu sinto, são impossíveis de descrever em palavras. Ao Titio Luzinho e à Titia Rosa, os melhores tios e padrinhos que alguém pode ter. Sempre presentes na minha vida, como meus segundos pais, me enchendo de amor e carinho.

Ao meu orientador Dr. Marco, por ter me recebido como sua IC em 2011 e ter me orientado e apoiado durante todos esses anos de IC, mestrado e doutorado. À Professora Erna, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, por todos os ensinamentos compartilhados e apoio ao longo destes anos de doutorado.

À banca examinadora pela disponibilidade e sugestões que serão feitas, tenho certeza de que contribuirão muito para este trabalho.

A todos os professores do labvírus, Beta, Cláudio, Gi, Jônatas e Rodrigo, por me acolherem tão bem. Aprendi imensamente com cada um. Em especial ao Rodrigo, por aceitar ser meu relator.

A todos os pesquisadores do IDV, Dr. Alexandre, Dr. Marcelo e em especial ao Dr. Pedro, por toda sua disponibilidade para me ajudar e ensinar. À Lídia, nossa secretária maravilhosa, que sempre me salvou com as listas de compras e burocracias.

À Dra Aline Bentes e toda equipe do HIJPII, principalmente às crianças e aos pais que aceitaram contribuir e foram fundamentais neste trabalho.

À toda equipe do Biotério do IRR, em especial a Fernanda, Rosa e Ana, por toda disponibilidade e auxílio, sou imensamente grata.

Às Plataformas de Sequenciamento, de Citometria de Fluxo e de PCR do IRR e suas respectivas técnicas, Renata e Ana, Tiza e Viviane, que também foram fundamentais neste trabalho.

Ao Departamento de microbiologia e todos os seus professores, por toda estrutura e auxílio. Às agências de fomento por todo apoio financeiro.

A todos os alunos e amigos do labvírus, vocês tornaram estes anos mais leves e divertidos. Em especial a Ana Gabi, Walter, Naty Ingrid, Nidiazinha, Ana Luiza e Mateus, vocês foram essenciais nestes anos, sou muito grata por ter feito amigos tão especiais.

Ao meu charraíá, Paulinha e Ana Crispim, outros presentes que labvírus me deu. Sou eternamente grata e feliz por ter vocês em minha vida. Amo vocês demais!

Às Thaís, Bia, Andreza, Sabryna e Gu, presentes que o IDV me deu, obrigada pela cia, pelos desabafos, pelas risadas e pelos CDFs.

Às minhas papagaias, Mari, Lulu, Fran, Lu e Bruna, que estão comigo desde o primeiro semestre de Biologia, compartilhando todos os momentos e fazendo minha vida mais leve e feliz. Amo muito vocês e quero tê-las sempre presente.

À Ju e Isa, meu trio desde o colégio, uma amizade que eu não abro mão nunca, que eu amo muito e quero cultivar sempre.

À Gi, que mesmo a distância esteve presente em todos os momentos.

Sou muito grata e realizada por ter amigos assim em minha vida.

À Deus, que colocou todas essas pessoas em minha vida e que sempre ilumina meu caminho.

## RESUMO

As infecções virais são um problema de saúde pública global e um fardo social e econômico grave. Nas infecções virais, o sistema imune protege o organismo, sendo o sistema imune inato a primeira linha de defesa a ser ativada. A detecção dos vírus pode ser feita por receptores do tipo toll (TLRs), que são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e por estimular a produção de citocinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune inata, principalmente a via de TLRs, diferenciando biologicamente duas amostras de Zika virus (ZIKV) isoladas no Brasil e avaliar os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) de genes do sistema imune inato de crianças com manifestações de sistema nervoso central (SNC) causadas por ZIKV, dengue virus (DENV) e de crianças com Covid-19 grave. Duas amostras de ZIKV isoladas no Brasil (PE243 e SPH) e uma amostra africana adaptada em murinos (MR766), usado como controle, foram empregados no estudo de indução de TLRs em células CHO transfectadas estavelmente com TLR2 e TLR4. Os resultados comprovaram a ativação de TLR2, com uma resposta diferencial reduzida do ZIKV SPH. As amostras também foram utilizadas no estudo da infecção em camundongos imunocompetentes e nocautes. Camundongos C57BL/6 infectados pela via subcutânea não apresentaram sinais ou perda de peso, porém quando infectados pela via intracraniana (IC) com ZIKV PE243 apresentaram ganho de peso significativamente menor. Nos camundongos C57BL/6 infectados via IC com ZIKV SPH foi detectado aumento significativo de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) no cérebro, fígado e baço. Camundongos nocautes para os genes myeloid differentiation factor 88 (*myd88*) e *tlr2/9* infectados via IC apresentaram ganho de peso significativamente menor e, em camundongos *myd88*<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243, foi identificado aumento significativo de monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) no cérebro. O RNA viral foi detectado nos cérebros, fígados, baços, rins e testículos dos camundongos C57BL/6 e *myd88*<sup>-/-</sup> infectados via IC. Camundongos nocautes para o gene nitric oxide synthase 2 (*nos2*) não apresentaram sinais ou redução de peso. Estes resultados confirmam as diferenças biológicas entre as amostras de ZIKV isoladas no Brasil e a importância do sistema imune inato na infecção por ZIKV. A avaliação dos SNPs rs3775291 e rs5743316 (*tlr3*), rs179008 (*tlr7*), rs8177374 (TIR domain containing adaptor protein - *tirap*), rs387907272 (*myd88*), rs61942233 (2',5'-oligoadenylate synthetase - *oas3*) e rs1024611 (*mcp-1*) foi feita em 19 crianças com manifestações de SNC e RNA genômico de ZIKV no líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo que 18 apresentaram SNPs em ao menos um dos genes estudados e foi detectada uma frequência do alelo mutado do SNP rs8177374 de 0.21 enquanto a média das populações do banco de dados é de 0.11. Em 39 crianças com manifestações de SNC e RNA genômico de DENV no LCR, foi analisado o SNP rs8177374 e foi detectada frequência do alelo mutado de 0.29. Na análise de 59 amostras de crianças com Covid-19 foi observada frequência de 0,17 para o SNP rs3775291, enquanto a média das populações do banco de dados foi de 0,27. Em estudo de casos, foi observada uma associação entre o SNP rs179008 e hepatite por SARS-CoV-2 e dos SNPs rs179008 e rs8177374 e quadro grave de Covid-19 em 3 crianças com anemia falciforme. Estes resultados demonstram a importância de mutações em genes relacionados ao sistema imune nas infecções por ZIKV, DENV e SARS-CoV-2.

**Palavras chaves:** sistema imune inato, toll like receptors (TLR), ZIKV, DENV, SARS-CoV-2, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

## ABSTRACT

Viral infections are a global public health problem and a severe social and economic burden. In viral infections, the immune system protects the body, with the innate immune system being the first line of defense to be activated. The detection of viruses can be done by toll-like receptors (TLRs), which are responsible for recognizing pathogens and stimulating the production of cytokines. The objective of this work was to evaluate the innate immune response, mainly via the TLRs, biologically differentiate two samples of Zika virus (ZIKV) isolated in Brazil and evaluate the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes of the innate immune system of children with manifestations of the central nervous system (CNS) caused by ZIKV, dengue virus (DENV) and children with severe Covid-19. Two ZIKV strains isolated in Brazil (PE243 and SPH) and an African strain adapted in mice (MR766), used as control, were used to study the TLRs induction in CHO cells stably transfected with TLR2 and TLR4. The results confirmed the activation of TLR2, with reduced differential response of the ZIKV SPH. The strains were also used for infection in immunocompetent and knockout mice. C57BL/6 mice infected by the subcutaneous route showed no signs of weight loss, but they showed less significant weight gain when infected by the intracranial route (IC) with ZIKV PE243. In C57BL/6 mice infected via IC with ZIKV SPH, a significant increase in interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was detected in the brain, liver, and spleen. Knockout mice for the myeloid differentiation factor 88 (myd88) and tlr2/9 genes infected via IC showed significantly less weight gain, and an increased monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was identified in the brain of myd88<sup>-/-</sup> mice infected with ZIKV PE243. Viral RNA was detected in the brains, livers, spleens, kidneys, and testes of C57BL/6 and myd88<sup>-/-</sup> mice infected via IC. Knockout mice for the nitric oxide synthase 2 gene (nos2) showed no signs or weight reduction. These results confirm the biological differences between the ZIKV isolates from Brazil and the importance of the innate immune system in ZIKV infection. The evaluation of SNPs rs3775291 and rs5743316 (tlr3), rs179008 (tlr7), rs8177374 (TIR domain -containing adapter protein - tirap), rs387907272 (myd88), rs61942233 (2',5'-oligoadenylate synthetase - oas3) and rs1024611 (mcp- 1) was performed in 19 children with CNS manifestations and ZIKV genomic RNA in the cerebrospinal fluid (CSF). Eighteen had SNPs in at least one of the genes studied, and a 0.21 frequency of the mutated allele of SNP rs8177374 was detected while, the mean of the database populations is 0.11. In 39 children with CNS manifestations and DENV genomic RNA in CSF, SNP rs8177374 was analyzed, and a 0.29 mutated allele frequency was detected. Analysis of 59 children with Covid-19, showed a 0.17 frequency for the SNP rs3775291, while the mean of the populations in the database was 0.27. A case study observed an association between SNP rs179008 and hepatitis by SARS-CoV-2 and SNPs rs179008 and rs8177374 and severe Covid-19 in 3 children with sickle cell anemia. These results demonstrate the importance of mutations in genes related to the immune system in ZIKV, DENV, and SARS-CoV-2 infections.

**Keywords:** innate immune system, toll like receptors (TLR), ZIKV, DENV, SARS-CoV-2, single nucleotide polymorphism (SNP).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Toll like receptors (TLRs): localização, padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), vias de sinalização e estrutura.....	25
<b>Figura 2:</b> Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em indivíduos da mesma espécie.....	30
<b>Figura 3:</b> Organização do genoma e do processamento da poliproteína dos flavivírus.....	33
<b>Figura 4:</b> Ciclo de multiplicação dos flavivírus.....	35
<b>Figura 5:</b> Classificação de casos de dengue e níveis de gravidade.....	41
<b>Figura 6:</b> Partículas de SARS-CoV observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	43
<b>Figura 7:</b> Desenho esquemático representativo da estrutura da partícula viral e do genoma dos coronavírus.....	44
<b>Figura 8:</b> Ciclo de multiplicação dos coronavírus.....	46
<b>Figura 9:</b> Fluxograma das estratégias de trabalho.....	54
<b>Figura 10:</b> Ilustração da inoculação intracraniana em camundongos.....	60
<b>Figura 11:</b> Análise do SNP rs179008 no gene <i>tlr7</i> em DNA de crianças infectadas com SARS-CoV-2 no programa novoSNP.....	69
<b>Figura 12:</b> Ativação de TLR2 por ZIKV.....	71
<b>Figura 13:</b> Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção subcutânea com ZIKV.....	73
<b>Figura 14:</b> Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos à inoculação subcutânea com ZIKV.....	73
<b>Figura 15:</b> Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos à inoculação intracraniana com ZIKV.....	75
<b>Figura 16:</b> Sinais clínicos apresentados por camundongos C57BL/6 infectados via intracraniana com $4 \times 10^2$ p.f.u. de ZIKV MR766.....	76
<b>Figura 17:</b> Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	77
<b>Figura 18:</b> Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com $4 \times 10^2$ p.f.u de ZIKV.....	78
<b>Figura 19:</b> Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com $4 \times 10^2$ p.f.u de ZIKV.....	79

<b>Figura 20:</b> Quantificação de citocinas no 3º d.p.i. em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados via intracraniana com ZIKV.....	81
<b>Figura 21:</b> Quantificação de citocinas no soro de camundongos C57BL/6 infectados via intracraniana com ZIKV.....	82
<b>Figura 22:</b> Curva de sobrevivência em camundongos MyD88 <sup>-/-</sup> de 6 a 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	85
<b>Figura 23:</b> Variação percentual de peso em camundongos MyD88 <sup>-/-</sup> de 6 a 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	85
<b>Figura 24:</b> Quantificação de citocinas no cérebro e soro de camundongos MyD88 <sup>-/-</sup> de 6 a 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	88
<b>Figura 25:</b> Curva de sobrevivência em camundongos TLR2/9 <sup>-/-</sup> de 8 a 10 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	93
<b>Figura 26:</b> Variação percentual de peso em camundongos TLR2/9 <sup>-/-</sup> de 8 a 10 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	95
<b>Figura 27:</b> Sinais clínicos apresentados por camundongos NOS <sup>-/-</sup> infectados via intracraniana com 4x10 <sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV MR766.....	96
<b>Figura 28:</b> Curva de sobrevivência em camundongos NOS2 <sup>-/-</sup> de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	97
<b>Figura 29:</b> Variação percentual de peso em camundongos NOS2 <sup>-/-</sup> de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.....	98
<b>Figura 30:</b> Detecção de SNP em crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.....	105
<b>Figura 31:</b> Detecção de citocinas no LCR de crianças com manifestações de SNC e infectadas com ZIKV.....	108
<b>Figura 32:</b> Detecção do SNP rs8177374 no gene <i>tirap</i> em crianças com manifestações de SNC e infectadas com DENV.....	118
<b>Figura 33:</b> Detecção de citocinas no LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV.....	121
<b>Figura 34:</b> Detecção de SNP em genes <i>tlr3</i> , <i>tlr7</i> , <i>tirap</i> , <i>myd88</i> , <i>oas3</i> e <i>mcp-1</i> de crianças infectadas com SARS-CoV-2.....	134

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Iniciadores e sonda utilizados para detecção de RNA viral.....	62
<b>Tabela 2:</b> Iniciadores utilizados na análise de SNP.....	66
<b>Tabela 3:</b> Detecção de RNA viral em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.....	83
<b>Tabela 4:</b> Detecção de RNA viral em órgãos de camundongos <i>myd88</i> <sup>-/-</sup> infectados com ZIKV.....	90
<b>Tabela 5:</b> Infecção intracraniana em camundongos C57BL/6, <i>myd88</i> <sup>-/-</sup> , <i>nos2</i> <sup>-/-</sup> e <i>tlr2</i> <sup>9-/-</sup> .....	100
<b>Tabela 6:</b> Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.....	104
<b>Tabela 7:</b> Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes positivos para ZIKV versus frequências do dbSNP.....	107
<b>Tabela 8:</b> Detecção de SNP e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com ZIKV.....	111
<b>Tabela 9:</b> Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.....	112
<b>Tabela 10:</b> Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-1.....	114
<b>Tabela 11:</b> Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-2.....	115
<b>Tabela 12:</b> Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-3.....	116
<b>Tabela 13:</b> Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-4.....	116
<b>Tabela 14:</b> Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com coinfeções de diferentes sorotipos de DENV.....	117
<b>Tabela 15:</b> Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes positivos para DENV versus frequências do dbSNP.....	119
<b>Tabela 16:</b> Detecção do SNP rs8177374 no gene <i>tirap</i> e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com DENV-1.....	123
<b>Tabela 17:</b> Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para DENV-1.....	124

<b>Tabela 18:</b> Detecção do SNP rs8177374 no gene <i>tirap</i> e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com DENV-2.....	126
<b>Tabela 19:</b> Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para DENV-2.....	127
<b>Tabela 20:</b> Detecção do SNP rs8177374 no gene <i>tirap</i> e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com DENV-3.....	128
<b>Tabela 21:</b> Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para DENV-3.....	129
<b>Tabela 22:</b> Detecção do SNP rs8177374 no gene <i>tirap</i> e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com DENV-4.....	130
<b>Tabela 23:</b> Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para DENV-4.....	130
<b>Tabela 24:</b> Detecção do SNP rs8177374 no gene <i>tirap</i> e quantificação de citocinas no LCR de crianças com coinfeção com diferentes sorotipos de DENV.....	131
<b>Tabela 25:</b> Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC com coinfeção com diferentes sorotipos de DENV.....	131
<b>Tabela 26:</b> Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes infectados com flavivírus versus frequências do dbSNP.....	132
<b>Tabela 27:</b> Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes com Covid-19 grave versus frequências do dbSNP.....	135
<b>Tabela 28:</b> Resultados laboratoriais, testes para hepatite, testes sorológicos e SNPs.....	139
<b>Tabela 29:</b> Resultados laboratoriais, teste para SARS-CoV-2 e SNPs.....	140

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- C** – Proteína do capsídeo
- CDS** - Cytosolic DNA sensors (Sensores citosólicos de DNA)
- CLR** - C-type lectin receptor (Receptor de lecitina do tipo C)
- DC** - Dendritic cell (Célula dendrítica)
- DENV** - Dengue virus
- DF** – Doença falciforme
- DNA** - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
- dsRNA** - double-strand RNA (RNA de fita dupla)
- E** – Proteína do Envelope
- ER** – Retículo endoplasmático
- FP** - Fusion peptide (Peptídeo de fusão)
- HIV** - Human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)
- HR1** - Heptad repeat 1 (Repetição heptada 1)
- HR2** - Heptad repeat 2 (Repetição heptada 2)
- HHV** – Vírus herpes humano (Human Herpes virus)
- ICTV** - International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus)
- IFN** - Interferon
- IFNAR** - Receptor de IFN
- IL** – Interleucina
- IRAK** - Interleukin-1 receptor (IL-1R) associated kinase (Quinase associada ao receptor de IL-1)
- IRF** – Interferon regulatory factor (Fator regulador de interferon)
- ISG** - IFN-stimulated genes (Genes estimulados por IFN)
- JEV** - *Japanese encephalitis virus* (Vírus da encefalite japonesa)
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- LRR** - Leucine-rich repeats (Repetições ricas em leucina)
- M** – Proteína de membrana
- MAL** - MyD88 adaptor-like (Adaptador tipo MyD88)
- MCP-1** - Monocyte chemoattractant protein-1 (Proteína quimioatraente de monócitos 1)
- mRNA** – RNA mensageiro
- MyD88** - Myeloid differentiation factor 88 (Fator de diferenciação mieloide 88)
- N** - Nucleocapsídeo
- NCR** – Non-coding regions (regiões não codificantes)
- NF-κB** – Nuclear factor kappa B (Fator nuclear kappa B)
- NK** - Natural killer cell (Célula natural killer)
- NKT** – Natural killer T cell
- NLR** - NOD-like receptor (Receptor tipo NOD)
- nm** – nanômetro
- NOD** - Nucleotide oligomerization domain (Domínio de oligomerização de nucleotídeos)
- NOS** – Nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetase)
- NS1** – Nonstructural protein 1 (Proteína não estrutural 1)
- NS2A** – Nonstructural protein 2A (Proteína não estrutural 2A)

**NS2B** – Nonstructural protein 2B (Proteína não estrutural 2B)  
**NS3** – Nonstructural protein 3 (Proteína não estrutural 3)  
**NS4A** – Nonstructural protein 4A (Proteína não estrutural 4A)  
**NS4B** – Nonstructural protein 4B (Proteína não estrutural 4B)  
**NS5** – Nonstructural protein 5 (Proteína não estrutural 5)  
**OAS** - 2',5'-Oligoadenylate synthetase (2'-5'-oligoadenilato sintetase)  
**ORF** - Open reading frames (Janela aberta de leitura)  
**PAMP** - Pathogen-associated molecular patterns (Padrões moleculares associados a patógenos)  
**pDC** - Plasmacytoid dendritic cells (Células dendríticas plasmocitoides)  
**prM** – Proteína precursora da proteína M  
**PRR** - Pattern recognition receptor (Receptor de reconhecimento de padrões)  
**RBD** - Receptor binding domain (domínio de ligação ao receptor)  
**RLR** - RIG-I-like receptor (Receptores tipo RIG-1)  
**RNA** – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)  
**RSV** - Respiratory syncytial virus (vírus sincicial respiratório)  
**S** - Spike  
**SARS-CoV-2** - Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2  
**SD1** - Subdomínio 1  
**SD2** - Subdomínio 2  
**SIMP** - síndrome inflamatória multissistêmica pediátrica  
**SNC** - Sistema nervoso central  
**SNP** - Single nucleotide polymorphism (Polimorfismos de nucleotídeo único)  
**SP** – Peptídeo sinal  
**ssRNA** - single-strand RNA (RNA de fita simples)  
**TIR** - Toll/IL-1R receptor (Receptor de IL-1/Toll)  
**TIRAP** - TIR Domain Containing Adaptor Protein (Proteína adaptadora contendo domínio TIR)  
**TLR** - Toll-like receptor (Receptor do tipo Toll)  
**TM** - Transmembrana  
**TNF** -Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)  
**TRAF** - TNF receptor-associated factor (Fator associado ao receptor de TNF)  
**TRAM** - TRIF-related adaptor molecule (Molécula adaptadora relacionada a TRIF)  
**TRIF** - TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (Adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN- $\beta$ )  
**WHO** - World Health Organization  
**WNV** - West Nile virus (Vírus do oeste do Nilo)  
**YFV** – Yellow fever virus (Vírus da febre amarela)  
**ZIKV** – Zika virus

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	17
1.1.	Impacto das epidemias no Brasil .....	17
1.2.	Interação do vírus com o hospedeiro .....	18
1.3.	Resposta imune do hospedeiro à infecção viral.....	20
1.3.1.	Resposta imune inata à infecção viral.....	23
1.3.2.	Receptores do tipo Toll (TLR) e moléculas adaptadoras .....	24
1.3.2.1.	TLR1, TLR2 e TLR6.....	27
1.3.2.2.	TLR3 .....	28
1.3.2.3.	TLR4 .....	28
1.3.2.4.	TLR5 .....	29
1.3.2.5.	TLR7 e TLR8.....	29
1.3.2.6.	TLR9 .....	29
1.4.	Polimorfismos genéticos de genes do sistema imune inato .....	30
1.5.	Vírus.....	32
1.5.1.	Flavivírus.....	32
1.5.1.1.	Transmissão e epidemiologia de ZIKV e DENV .....	35
1.5.1.2.	Manifestações clínicas e patogênese de ZIKV e DENV .....	37
1.5.2.	Betacoronavírus .....	42
1.5.2.1.	Transmissão e epidemiologia.....	47
1.5.2.2.	Manifestações clínica e patogênese .....	48
2.	JUSTIFICATIVA .....	51
3.	OBJETIVOS .....	53
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1.	Estratégias de trabalho .....	54
4.2.	Cultivo celular.....	54
4.2.1.	Células C6/36.....	54
4.2.2.	Células Vero.....	55
4.2.3.	Células CHO .....	55
4.3.	Vírus.....	56
4.3.1.	Zika vírus (ZIKV) .....	56
4.3.1.1.	Multiplicação .....	56
4.3.1.2.	Titulação.....	56

4.4.	Ativação de TLR2 ou TLR4 em células CHO .....	57
4.5.	Modelo animal.....	58
4.5.1.	Vias de inoculação .....	58
4.5.1.1.	Infecção subcutânea (SC).....	58
4.5.1.2.	Infecção intracraniana (IC) .....	59
4.5.2.	qPCR para detecção de RNA viral.....	61
4.5.2.1.	Extração de RNA viral .....	61
4.5.2.2.	Extração de RNA total de tecidos .....	61
4.5.2.3.	qPCR One-step para ZIKV .....	62
4.5.3.	Determinação de título viral em órgãos de camundongos .....	63
4.5.4.	Cytometric Beads Array (CBA).....	63
4.6.	Amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano (LCR).....	63
4.6.1.	Detecção de citocinas em LCR de pacientes infectados com ZIKV e DENV.....	64
4.7.	Análise de SNP .....	64
4.7.1.	Desenho dos iniciadores.....	65
4.7.2.	Extração de DNA .....	66
4.7.3.	PCR para amplificação dos genes <i>tlr3</i> , <i>tlr7</i> , <i>tirap</i> , <i>myd88</i> , <i>mcp-1</i> e <i>oas367</i> .....	67
4.7.4.	Purificação do DNA amplificado por PCR .....	67
4.7.5.	Sequenciamento Sanger e análise das sequências.....	69
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
5.1.	Resposta imune inata, dependente de TLRs, contra flavivírus: ZIKV .	70
5.1.1.	Ativação de TLR2 e TLR4 <i>in vitro</i> em células CHO por ZIKV .....	70
5.1.2.	Modelos <i>in vivo</i> para estudo da resposta imune contra ZIKV .....	72
5.1.2.1.	Modelo de infecção por via SC em camundongos imunocompetentes infectados com ZIKV .....	72
5.1.2.2.	Modelo e infecção por via IC em camundongos imunocompetentes com ZIKV.....	74
5.1.2.2.1.	Susceptibilidade e variação percentual de peso em camundongos imunocompetentes infectados via IC.....	75
5.1.2.2.2.	Quantificação de citocinas em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados via IC com ZIKV. ....	80
5.1.2.3.	Modelo de infecção em camundongos nocautes para genes do sistema imune inato infectados com ZIKV.....	84
5.1.2.3.1.	Infecção por ZIKV em camundongos <i>MyD88<sup>-/-</sup></i> .....	84
5.1.2.3.1.1.	Susceptibilidade e variação percentual de peso e citocinas em camundongos <i>MyD88<sup>-/-</sup></i> infectados via IC.....	84

5.1.2.3.1.2. Quantificação de citocinas em órgãos de camundongos MyD88 infectados via IC com ZIKV .....	87
5.1.2.3.2. Infecção por ZIKV em camundongos TLR2/9 <sup>-/-</sup> .....	92
5.1.2.3.3. Infecção por ZIKV em camundongos NOS2 <sup>-/-</sup> .....	96
5.1.2.4. Súmula dos resultados obtidos na infecção intracraniana em camundongos imunocompetentes e nocautes infectados com ZIKV.....	99
5.2. Infecção e imunidade inata em crianças: ZIKV e DENV .....	103
5.2.1. Detecção de SNP e quantificação de citocinas em LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.....	103
5.2.2. Detecção de SNP no gene <i>tirap</i> e quantificação de citocinas em LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV.....	113
5.3. Análise comparativa das frequências observadas em pacientes infectados com flavivírus com o banco de dados dbSNP .....	132
5.4. Infecção e imunidade inata em crianças: SARS-CoV-2 .....	133
5.4.1. Análise de SNP em crianças infectadas com SARS-CoV-2.....	133
5.4.2. Impacto de SNP nas infecções por SARS-CoV-2: estudo de casos .	137
6. CONCLUSÕES .....	143
7. REFERÊNCIAS.....	145
8. ANEXOS .....	163
8.1. ANEXO I - CERTIFICADOS COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	164
8.2. ANEXO II – ARTIGOS PUBLICADOS.....	174
8.3. ANEXO III – ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO .....	212
8.4. ANEXO IV - OUTRAS ATIVIDADES.....	213

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Impacto das epidemias no Brasil

As infecções virais são um problema de saúde pública global e um fardo social e econômico grave para a humanidade. A disseminação dos vírus pode levar às epidemias ou pandemias, como ocorreu com influenza virus, human immunodeficiency virus (HIV), Ebola virus, dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), e, mais recentemente, com o surgimento do vírus severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (MORENS; FAUCI, 2020; SINGH; KOURY, 2021). Com o aumento do transporte global de mercadorias e pessoas, infecções virais que ficariam limitadas a uma região geográfica podem se disseminar mais facilmente (MORENS; FAUCI, 2020). Foi o que aconteceu com o SARS-CoV-2, que vem causando uma pandemia mundial desde sua emergência em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China (ZHU *et al.*, 2020). No Brasil, o primeiro caso confirmado foi em fevereiro de 2020, em São Paulo. Análises genéticas e o histórico de viagens do paciente confirmaram que este primeiro caso foi importado do norte da Itália (CANDIDO *et al.*, 2020; BRASIL 2021). Desde então, o número de casos e mortes no Brasil continua aumentando, sendo o 3º país com mais casos de Covid-19 confirmados e o 2º em número de óbitos, segundo o Painel de Controle da World Health Organization (WHO), acessado em maio de 2022.

No Brasil, também há arboviroses urbanas que fazem parte de um cenário epidemiológico complexo, como a circulação simultânea dos quatro sorotipos de DENV, além da circulação, a partir de 2014, do chikungunya virus (CHIKV) e, em 2015, de ZIKV (BRASIL 2020). O primeiro caso relatado de ZIKV foi em março de 2015 na Bahia, quando ocorreu um surto de uma doença exantemática, associada a febre, conjuntivite e artralgia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDE, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). Em outubro do mesmo ano, o vírus havia se disseminado para pelo menos 14 Estados brasileiros (PETERSEN *et al.*, 2016; WHO, 2015). No Brasil, o ZIKV foi relacionado a malformações fetais, devido ao aumento dos casos de malformações que ocorreram nos mesmos locais onde o vírus foi detectado. Além disso, o ZIKV foi detectado em tecidos cerebrais de fetos 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; SONG *et al.*, 2017).

A dengue é outra arbovirose endêmica no Brasil. A primeira epidemia na reemergência da dengue ocorreu na década de 1980 em Boa Vista, Roraima. Em 1986, ocorreram epidemias no estado do Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste. Desde então, a dengue é caracterizada por transmissão endêmica e epidêmica com a co-circulação dos quatro sorotipos virais (BRASIL 2017; BRASIL 2019). A dengue possui importante impacto econômico e social nas populações de áreas endêmicas e afeta todos os níveis sociais. O impacto da doença, porém é maior nas populações mais pobres, que vivem em áreas com abastecimento de água inadequado, infraestrutura precária e condições favoráveis para a multiplicação dos seus mosquitos vetores (BRASIL 2019). No Brasil, em 2002, foi instituído o Programa Nacional de Controle da Dengue, para apoio aos Estados e municípios nas ações de prevenção e controle da dengue (BRASIL 2017; BRASIL 2019). Entre 2003 e 2019, foram notificados mais de 11 milhões de casos prováveis de dengue no Brasil, sendo que os anos 2008, 2010, 2013, 2015 e 2016 foram considerados epidêmicos. Em 2008 houve circulação de DENV2, em 2010 e 2013 ocorreu a reintrodução de novos sorotipos e em 2015 e 2016 houve a introdução de chikungunya virus (CHIKV) e ZIKV, respectivamente. Entre 2003 e 2019, foram confirmados 6.234 óbitos por dengue, sendo que ano de 2015 concentrou o maior número de óbitos, com 863 mortes (BRASIL 2019).

Segundo a Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, do Ministério da Saúde, Covid-19, Zika e dengue são doenças de notificação compulsória e óbitos devem ser comunicados imediatamente ao Sistema de Vigilância.

## **1.2. Interação do vírus com o hospedeiro**

A infecção viral ocorre quando o inóculo contendo vírus é suficiente para estabelecer uma infecção no hospedeiro. O vírus deve inicialmente atingir e interagir com células suscetíveis à multiplicação viral, e a imunidade inata e a adaptativa serão ativadas para abortar a infecção (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

Para penetrar nas células hospedeiras, moléculas da superfície do vírus precisam interagir com receptores específicos na superfície celular. As interações com

esses receptores determinam o tropismo celular ou tecidual do vírus. Este tropismo determinará se o vírus terá a capacidade de infectar de forma eficiente uma espécie hospedeira específica ou se é capaz de infectar um novo hospedeiro (HEISE, 2014).

A multiplicação do vírus pode ficar localizada em algum órgão do corpo ou pode se tornar sistêmica após a disseminação pelas vias linfática e hematogênica. O sangue é o veículo mais eficaz e rápido para a disseminação de vírus pelo corpo, fenômeno denominado viremia. Quase todos os órgãos podem ser infectados através da corrente sanguínea, mas a maioria dos vírus tem tropismos para órgãos e tecidos bem definidos (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

Os vírus podem causar danos diretos, como os vírus citopáticos, nos quais a multiplicação viral produtiva leva à morte celular. O dano celular também pode ser causado pela resposta imune aumentada ou inadequada do hospedeiro induzida por vírus (HEISE, 2014). Quase todas as infecções virais causam o recrutamento e a ativação de células inflamatórias, principalmente macrófagos e, em algumas infecções, neutrófilos. Macrófagos e neutrófilos liberam várias moléculas, como citocinas citotóxicas, proteínas catiônicas, mediadores lipídicos, metaloproteinasas e espécies reativas de oxigênio, que induzem danos aos tecidos ou mau funcionamento dos órgãos. Tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa estão envolvidas na mediação do dano tecidual (ROUSE; SEHRAWAT, 2010).

A resposta imune é parte essencial da patogênese. A infiltração de células do sistema imune e a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios regulam a infecção viral. No entanto, estes processos também podem ser uma das principais causas de danos celulares e teciduais em algumas infecções e de muitos sintomas comuns de doenças virais, como febre, eritema, edema e aumento em tamanho dos linfonodos. Normalmente ocorre a modulação negativa da resposta imune após a resolução da infecção. Em alguns casos, porém pode ocorrer a tempestade de citocinas, ou seja, a liberação em larga escala de citocinas inflamatórias e de mediadores de estresse que levam a danos graves, até mesmo letais para o hospedeiro (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

A gravidade da lesão causada pela infecção viral depende de vários fatores. Alguns vírus têm propriedades intrínsecas que dificultam o controle da infecção pelo

sistema imune, e as tentativas do hospedeiro para obter o controle resultam em danos graves aos tecidos. Muitos outros vírus são controlados com sucesso na maioria dos indivíduos, mas o dano tecidual ocorre em indivíduos que possuem predisposição genética ou adquirida que afeta um ou mais componentes do sistema imune inato ou adaptativo. Algumas infecções que normalmente são bem controladas podem causar danos extensos nos tecidos em circunstâncias incomuns, que podem estar relacionadas com a dose de vírus, a via de exposição, a idade do hospedeiro, a reação cruzada ou a coinfeção com outros vírus (ROUSE; SEHRAWAT, 2010).

### **1.3. Resposta imune do hospedeiro à infecção viral**

O sistema imune protege o corpo contra agentes infecciosos, de danos causados por eles e de outras substâncias nocivas, como toxinas de insetos, por meio de diversas células efetoras e moléculas produzidas por estas células. Para que a proteção seja eficaz, o sistema imune precisa reconhecer e conter a infecção, regulando a resposta para não causar prejuízo, e proteger contra a recorrência da infecção, por meio da memória imunológica (MURPHY; TRAVERS, 2010).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa e inclui os mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro que são codificados em suas formas funcionais maduras pelos genes da linhagem germinativa do hospedeiro (CHAPLIN, 2010). Ele é baseado principalmente em barreiras físicas e químicas à infecção, e em diferentes tipos de células que reconhecem patógenos invasores e ativam as respostas imunes (BASSET et al., 2003; MEDZHITOV, 2000; MOGENSEN, 2009). As barreiras físicas e químicas são a epiderme, o epitélio respiratório ciliado, o endotélio vascular e as superfícies mucosas (BASSET et al., 2003; MOGENSEN, 2009). Células dendríticas (DCs) apresentadoras de antígenos, macrófagos fagocíticos e granulócitos e células citotóxicas natural killer (NKs) são os tipos celulares envolvidos da resposta inata (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; MOGENSEN, 2009).

O sistema imune inato também inclui receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptor - PRR), que são receptores ligados à membrana e proteínas citoplasmáticas que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns - PAMP), que são expressos nas superfícies de microrganismos invasores. Este sistema inclui também proteínas

solúveis e pequenas moléculas bioativas que estão presentes em fluidos biológicos ou que são liberadas das células à medida que são ativadas, como as citocinas, que regulam a função de outras células, e as quimiocinas, que atraem leucócitos inflamatórios, mediadores lipídicos da inflamação, espécies reativas de radicais livres e aminas e enzimas bioativas, que contribuem para a inflamação dos tecidos (CHAPLIN, 2010). O sistema imune inato também possui papel crítico na ativação e regulação da imunidade adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

O sistema imune adaptativo é composto principalmente dos receptores específicos do antígeno expressos nas superfícies dos linfócitos T e B. Ao contrário das moléculas de reconhecimento codificadas pela linhagem germinativa da resposta imune inata, os receptores antígeno-específicos da resposta adaptativa são codificados por genes que são montados por rearranjo somático de elementos gênicos da linhagem germinativa para formar os receptores de célula T e B. A montagem dos receptores de antígenos a partir de uma coleção de algumas centenas de elementos gênicos codificados por linhagem germinativa permite a formação de milhões de receptores de antígenos diferentes, cada um deles com especificidade potencialmente única para um antígeno (CHAPLIN, 2010). Portanto, a resposta imune adaptativa é específica, e desenvolvida durante a vida do indivíduo como uma adaptação à infecção por um patógeno específico. A produção de anticorpos ocorre contra um patógeno específico ou seus produtos. Em muitos casos, a resposta imune adaptativa resulta em memória imunológica, conferindo imunidade protetora, por toda a vida, contra reinfecções pelo mesmo patógeno (MURPHY; TRAVERS, 2010).

Como seres humanos, estamos sob constante ataque de microrganismos invasores, incluindo os vírus. A resposta imune se inicia com a detecção da infecção viral pelo sistema imune inato, principalmente pela detecção de ácidos nucleicos virais pelos PRRs. Após o reconhecimento, interferons (IFN) tipo I e tipo III, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são produzidas para ativar a inflamação (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; SCHOGGINS, 2019).

Citocinas e quimiocinas são importantes moduladores das respostas imunes inata e adaptativa. São produzidas por células imunes e por células epiteliais e endoteliais e possuem efeitos locais e sistêmicos. Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina (IL) 1 (IL-1) e IL-6, induzem febre e

regulam positivamente a resposta de fase aguda. Essas citocinas também aumentam a resposta epitelial ao patógeno e induzem a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, aumentando assim a diapedese dos fagócitos (GUIDOTTI; CHISARI, 2000). A IL-1 é responsável pelo início da inflamação (Dinarello, 2018).

Muitas citocinas são conhecidas por desempenhar um papel na defesa do hospedeiro contra infecções virais. Algumas destas citocinas, como IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , têm o potencial de desencadear a ativação de vias antivirais intracelulares após se ligarem a receptores específicos na superfície de células infectadas. Outras citocinas, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-18, contribuem indiretamente para a resposta antiviral, modulando vários aspectos da resposta imune, incluindo a regulação de IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (GUIDOTTI; CHISARI, 2000).

A maioria das células do corpo responde a uma infecção viral por meio da secreção de IFN tipo I. Por outro lado, a produção de IFN tipo III e TNF é predominantemente restrita a células do sistema imunológico, como células NK, células T natural killer (NKT), células T auxiliares, células T citotóxicas, macrófagos e DCs. Coletivamente, essas citocinas podem inibir a multiplicação de muitos vírus e até mesmo eliminar vírus suscetíveis de células infectadas de forma não citopática (GUIDOTTI; CHISARI, 2000).

Os IFN tipo I e III são poderosos agentes antivirais, pois promovem a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs), que codificam fatores diretos de restrição do vírus, estabelecendo-se assim o “estado antiviral” em células vizinhas não infectadas. Proteínas codificadas por centenas de ISGs exercem sua atividade antiviral impedindo a penetração, replicação e o brotamento viral (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; SCHOGGINS, 2019). A produção de IFNs tipo I desencadeia a transcrição de muitos genes induzíveis por IFN, que influenciam a síntese de proteínas, regulação do crescimento e apoptose. Os IFNs do tipo I também aumentam a maturação de DCs, a citotoxicidade de células NK e a diferenciação de linfócitos T citotóxicos específicos de vírus, proporcionando assim uma importante ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (HONDA; TAKAOKA; TANIGUCHI, 2006; JENSEN; THOMSEN, 2012). IFN tipo III desencadeia uma resposta menos inflamatória e concentrada em superfícies epiteliais e de barreira e possui efeitos únicos nas células hematopoiéticas, principalmente neutrófilos (Lazear, 2019).

Citocinas pró-inflamatórias ajudam a moldar a resposta imune geral, recrutando células imunes para o local da infecção e ativando o sistema imune adaptativo (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; MEDZHITOV, 2001). Assim, o sistema imune inato potencializa a resposta imune adaptativa, na qual anticorpos específicos neutralizam os vírus e as células T citotóxicas ativadas matam as células infectadas, levando à eliminação do vírus (CARTY; GUY; BOWIE, 2021).

### **1.3.1. Resposta imune inata à infecção viral**

Como mencionado, o sistema imune inato é essencial para a detecção de vírus e constitui a primeira linha de defesa, desempenhando um papel crucial no reconhecimento precoce e desencadeamento de uma resposta pró-inflamatória (MEDZHITOV, 2000; MOGENSEN, 2009; SINGH, 2021). A capacidade do sistema imune inato de reconhecer e limitar a infecção é baseada principalmente na ativação do complemento, fagocitose, autofagia e ativação da resposta imune por diferentes famílias de receptores (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; MOGENSEN, 2009). O modo pelo qual o hospedeiro detecta e responde à infecção viral determina o desfecho da infecção (CARTY; GUY; BOWIE, 2021).

A detecção de patógenos pelo sistema imune inato ocorre através de PRRs, proteínas expressas em uma variedade de células que analisam e monitoram os espaços extra e intracelular detectando moléculas microbianas conservadas, os PAMPs, que servem como indicadores de infecção (BLASIUS; BEUTLER, 2010; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; JENSEN; THOMSEN, 2012; KAWAI; AKIRA, 2010; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; MEDZHITOV, 2007; BRUBAKER et al, 2015; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). PAMPs são únicos para os vírus e outros microrganismos e não são produzidos pelas células hospedeiras. Diferentes tipos de estruturas moleculares podem agir como PAMPs, como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos, flagelina, ácido lipoteicoico, RNA de fita dupla (dsRNA), RNA de fita simples (ssRNA), DNA e DNA CpG não metilado (MOGENSEN, 2009; SINGH, 2021). Os PAMPs virais geralmente carregam assinaturas moleculares ou subcelulares distintas, apresentam características moleculares únicas do genoma viral ou intermediários de replicação viral (IWASAKI, 2012). A detecção de patógenos pode ser feita por meio do reconhecimento de seus genomas ou de ácidos nucleicos que se acumulam durante a replicação (THOMPSON et al., 2011).

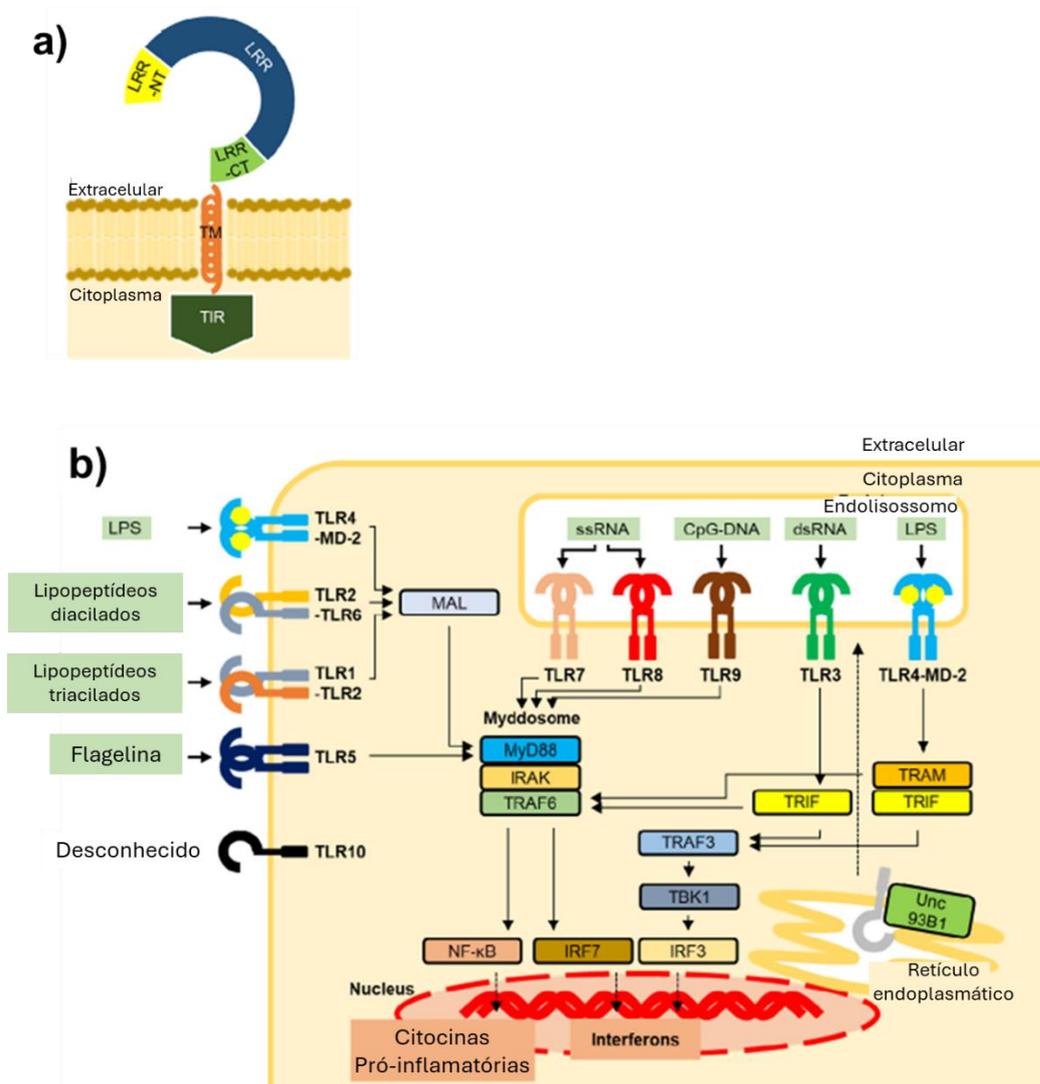
O sistema imune inato dispõe de uma variedade de PRRs que podem ser expressos na superfície das células, como DCs, macrófagos e neutrófilos, em compartimentos intracelulares ou secretados na corrente sanguínea e nos fluidos dos tecidos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; RUSLAN MEDZHITOV; JANEWAY, 1997). Com base em sua localização, os PRRs podem ser classificados em: (i) PRRs ligados à membrana, como receptores do tipo Toll (toll-like receptor - TLRs) e, (ii) receptores de lectina do tipo C (C-type lectin receptor - CLRs), que são encontrados na superfície celular ou em compartimentos endocíticos e detectam a presença de ligantes microbianos no espaço extracelular e dentro dos endossomos. Os PRRs citoplasmáticos detectam a presença de patógenos intracelulares, como receptores do tipo I do gene induzível pelo ácido retinoico (RIG-I-like receptor - RLRs), receptores semelhantes ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeos (nucleotide oligomerization domain - NOD) (NLRs) e sensores citosólicos de DNA (cytosolic DNA sensors - CDS) (BRUBAKER et al., 2015; GOUBAU et al., 2013; SINGH; KOURY, 2021).

A detecção eficaz de PAMPs pelos PRRs induz rapidamente a resposta imune do hospedeiro por meio da ativação de vias de sinalização complexas, que induzem resposta inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas, facilitando a eliminação do patógeno (BLASIUS; BEUTLER, 2010; KAWAI; AKIRA, 2010; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; MEDZHITOV, 2007). Os vírus possuem tropismo para diversos órgãos e tecidos, apresentam diferenças no ciclo de multiplicação e no genoma que pode ser de DNA ou de RNA de polaridade positiva ou negativa. Desta forma, as células hospedeiras podem reconhecer os vírus por meio de uma variedade de receptores do sistema imune inato. No ambiente exterior das células os vírus são detectados pelos receptores transmembrana, como os TLRs sendo que as infecções virais citosólicas são detectadas por receptores citosólicos, como RLRs e NLRs (AOSHI et al., 2012).

### **1.3.2. Receptores do tipo Toll (TLR) e moléculas adaptadoras**

TLRs são receptores transmembrana do tipo I que possuem um domínio N-terminal extracelular ou intraendossomal composto por repetições ricas em leucina (leucine-rich repeats - LRR), um segmento transmembrana (TM) e um domínio C-terminal intracelular homólogo de receptor toll/interleucina 1 (toll/IL-1R receptor - TIR) (ASAMI; SHIMIZU, 2021; CARTY; GUY; BOWIE, 2021; FITZGERALD; KAGAN, 2020)

(Figura 1a). O domínio LRR é responsável pelo reconhecimento de PAMPs, enquanto o domínio TIR citoplasmático é responsável pela transdução de sinal que inicia cascatas de sinalização, interagindo com proteínas adaptadoras tais como o fator de diferenciação mieloide 88 (myeloid differentiation factor 88 - MyD88); adaptador tipo MyD88 (MyD88 adaptor-like - MAL); adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN- $\beta$  (TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  - TRIF); molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRIF-related adaptor molecule - TRAM) (Figura 1a) (ASAMI; SHIMIZU, 2021; O'NEILL; BOWIE, 2007).



**Figura 1: Toll like receptors (TLRs): localização, padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), vias de sinalização e estrutura.** (a) Representação esquemática de TLR. O domínio extracelular é composto pelas regiões N-terminal (LRR-NT), LRR e C-terminal (LRR-CT), seguidas por um único segmento transmembrana (TM) e um domínio TIR intracelular (TIR) (b) Ilustração esquemática da via de sinalização de TLR e dos PAMPs específicos. A sinalização de TLR é iniciada pelo reconhecimento do PAMP, seguido pela interação com proteínas adaptadoras, como MyD88, MAL, TRIF e TRAM. A via de sinalização induz a expressão de citocinas inflamatórias ou IFN tipo I (ASAMI; SHIMIZU, 2021).

Para induzir a resposta inflamatória, os TLRs transduzem sinais através do domínio TIR, em duas vias principais dependentes principalmente dos adaptadores MyD88 ou TRIF (Figura 1b) (ASAMI; SHIMIZU, 2021; KAWAI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2003). A via dependente de MyD88 é ativada por todos os TLRs, exceto TLR3, que apenas sinaliza através do TRIF (Figura 1b) (LESTER; LI, 2014; YAMAMOTO et al., 2002). O TLR4 ativa as duas vias, dependente de MyD88 e TRIF (Figura 1b) (KAWAI; AKIRA, 2010; LESTER; LI, 2014; TAKEDA; AKIRA, 2005). Após a detecção viral, a cascata de sinalização ativa fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (nuclear factor kappa B - NF- $\kappa$ B) e fatores reguladores de IFN (IFN regulatory factor - IRFs), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e de IFN tipo I (Figura 1b) (ASAMI; SHIMIZU, 2021; KAWAI; AKIRA, 2010).

Foram identificados 10 TLRs funcionais em humanos (TLR1-10) e 12 em camundongos (TLR1-9, 11-13) com TLR1-TLR9 sendo conservado em ambas as espécies. Os ligantes para todos os TLRs foram determinados, exceto para TLR10 humano e TLR12 e 13 de camundongo. O TLR10 de camundongo não é funcional (AKIRA; TAKEDA, 2004; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010; LEE; AVALOS; PLOEGH, 2012).

Os TLRs são expressos em várias células imunes, como macrófagos, DCs, células B e tipos específicos de células T e em células não imunes, como fibroblastos e células epiteliais. A expressão de TLRs não é estática, uma vez que é modulada rapidamente em resposta a patógenos, a uma variedade de citocinas e aos estresses ambientais (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Os TLRs podem ser expressos nas membranas celulares, como os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 10, que reconhecem predominantemente componentes bacterianos, como lipídios, lipoproteínas e proteínas, ou podem ser expressos em endossomos, como os TLRs 3, 7, 8 e 9, que estão associados à detecção de ácidos nucleicos (ASAMI; SHIMIZU, 2021; FITZGERALD; KAGAN, 2020; IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

Cada TLR tem uma função distinta em termos de reconhecimento de PAMPs e resposta imune (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010). Em humanos, os TLRs 2, 3, 4, 7 e 8 são considerados importantes no reconhecimento de componentes estruturais de vírus de RNA, incluindo dsRNA, ssRNA e glicoproteínas de superfície (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; JENSEN; THOMSEN, 2012). A

presença de infecções virais é detectada principalmente através de ácidos nucleicos pelos TLRs endossômicos. Porém, TLRs de superfície, como TLR2 e TLR4, também foram associados à detecção de vírus, pelo reconhecimento de proteínas da superfície do vírus (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; FITZGERALD; KAGAN, 2020; LESTER; LI, 2014).

### **1.3.2.1. TLR1, TLR2 e TLR6**

Os TLRs podem formar heterodímeros ou homodímeros, porém a maioria forma homodímeros, com exceção do TLR2 que forma heterodímero com TLR1 ou TLR6 (Figura 1b). Isto permite o reconhecimento diferencial de lipopeptídeos com TLR1/TLR2 reconhecendo lipopeptídeos triacilados de bactérias Gram-negativas e micoplasma, enquanto TLR2/TLR6 reconhece lipopeptídeos diacilados de bactérias Gram-positivas e micoplasma (Figura 1b) (KAWAI; AKIRA, 2010; LEE; AVALOS; PLOEGH, 2012).

O TLR2 está envolvido no reconhecimento de diversos PAMPs derivados de bactérias, fungos, parasitas e vírus, tais como lipopeptídeos de bactérias, peptideoglicano e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas, lipoarabinomano de micobactérias, zimosan de fungos, tGPI-mucina de *Trypanosoma cruzi* e a hemaglutinina do vírus do sarampo (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010). A ativação de TLR2 induz principalmente a produção de citocinas inflamatórias, mas não induz IFN tipo I por macrófagos e DCs. Entretanto, foi demonstrado que TLR2 pode desencadear a produção de IFN tipo I por monócitos inflamatórios em resposta à infecção pelo vírus vaccínia (BARBALAT et al., 2009; KAWAI; AKIRA, 2010). Também foi demonstrado que TLR2 contribui para a produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  em baços de camundongos infectados com cytomegalovírus murino (LESTER; LI, 2014; SZOMOLANYI-TSUDA et al., 2006), e que TLR2 e TLR6 reconhecem a proteína NS1 de DENV (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; CHEN; NG; CHU, 2015). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o TLR2 atua em conjunto com TLR9 para estimular a resposta antiviral inata, protegendo contra infecção cerebral do human herpes virus type 1 (HHV-1) em modelo murino (ZOLINI et al., 2014). Além disso, o TLR2 está envolvido em respostas do hospedeiro a infecções pelo lymphocytic choriomeningitis virus (ZHOU et al., 2005), varicella-zoster virus (WANG

et al., 2005) e sincicial respiratory virus (MURAWSKI et al., 2009), embora os PAMPs virais detectados ainda não tenham sido identificados (LESTER; LI, 2014).

#### **1.3.2.2. TLR3**

TLR3 reconhece dsRNA (Figura 1b), sendo que vários vírus possuem genoma de dsRNA ou formam dsRNA durante o ciclo de multiplicação. ZHANG e colaboradores (2007) mostraram que o TLR3 protege contra o HHV-1. O TLR3 é expresso em células imunes, como DCs, macrófagos, NK e células não imunes, como epiteliais, endoteliais, fibroblastos, astrócitos e hepatócitos (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; LESTER; LI, 2014). No sistema nervoso central (SNC), o TLR3 é expresso em neurônios, astrócitos e microglia, sugerindo um papel antiviral fundamental (CARTY et al., 2014; CARTY; GUY; BOWIE, 2021). Após o reconhecimento de dsRNA, o TLR3 recruta a proteína adaptadora TRIF, o único adaptador utilizado pelo TLR3, o qual recruta o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), que ativa NF- $\kappa$ B, e TRAF3, que ativam os membros da família de IRF, como IRF3 e IRF7 (Figura 1b). A cascata de sinalização estimula a translocação de fatores de transcrição para o núcleo, ativando a expressão gênica de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e IFNs tipo I e tipo III (Figura 1b) (CARTY; GUY; BOWIE, 2021b; FITZGERALD; KAGAN, 2020).

#### **1.3.2.3. TLR4**

TLR4 foi o primeiro TLR a ser caracterizado, e com a sua descoberta houve a primeira indicação de que os TLRs de mamíferos poderiam funcionar como PRRs (BRUBAKER et al., 2015; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). TLR4 reconhece principalmente LPS (Figura 1b), um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; KAWAI; AKIRA, 2010). TLR4 reconhece a proteína de fusão do respiratory syncytial virus (RSV) (JENSEN; THOMSEN, 2012; KURT-JONES et al., 2000) e induz citocinas em resposta ao vírus coxsackie B4 (JENSEN; THOMSEN, 2012; TRIANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2004). Além disso, o TLR4 também reconhece as proteínas do envelope mouse mammary tumor virus e do murine leukemia virus, desencadeando a maturação de DCs e expressão de citocinas pró-inflamatórias (BURZYN et al., 2004; JENSEN; THOMSEN, 2012; RASSA et al., 2002).

#### 1.3.2.4. TLR5

TLR5 reconhece flagelina (Figura 1b), subunidades de proteínas que compõem os flagelos bacterianos (HAYASHI *et al.*, 2001; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). TLR5 é expresso em neutrófilos, monócitos, DCs e células epiteliais, principalmente em células epiteliais intestinais (BRUBAKER *et al.*, 2015; GEWIRTZ *et al.*, 2001; TAKEDA; AKIRA, 2005). Recentemente, foi demonstrado que partículas virais semelhantes a norovirus, um vírus reconhecido como uma das principais causas de surtos de gastroenterite em todo o mundo, são reconhecidas por TLR5 e TLR2 em células HEK recombinantes (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; PONTERIO *et al.*, 2019).

#### 1.3.2.5. TLR7 e TLR8

TLR7 e TLR8 reconhecem ssRNA (Figura 1b) principalmente de vírus que penetram por meio de endocitose, e o reconhecimento é dependente da acidificação do endossomo (LESTER; LI, 2014; LUND *et al.*, 2004). Após o reconhecimento de ssRNA, a via dependente de MyD88 é ativada, culminando na síntese de IFNs tipo I e tipo III e mediadores pró-inflamatórios através da ativação de IRF7 e NF- $\kappa$ B (Figura 1b), respectivamente, dependendo do tipo de célula (KAWAI *et al.*, 2004; KAWAI; AKIRA, 2010; LESTER; LI, 2014). TLR7 também reconhece poli(U) RNA sintético e alguns RNAs de interferência (HORNUNG *et al.*, 2005; KAWAI; AKIRA, 2010).

#### 1.3.2.6. TLR9

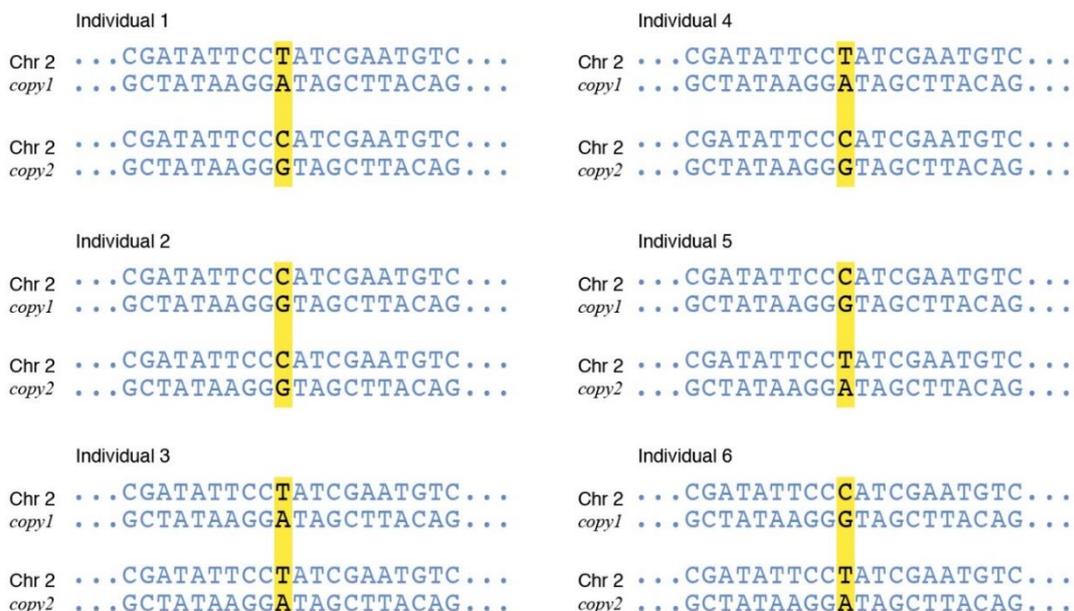
TLR9 reconhece DNA CpG não metilado (Figura 1b) presente em bactérias e vírus de DNA, como HHV, murine cytomegalovirus, human cytomegalovirus, variola virus e retrovírus, de RNA, como HIV (CARTY; GUY; BOWIE, 2021; LESTER; LI, 2014). Recentemente foi demonstrado que o TLR9 também desempenha um papel na detecção de vírus de RNA, como o DENV, devido à liberação de DNA mitocondrial de DCs humanas infectadas, que é reconhecido pelo TLR9 (CARTY; GUY; BOWIE, 2021b; LAI *et al.*, 2018). TLR9 é expresso em vários tipos de células imunes, incluindo macrófagos, células B, DCs mieloides, DCs convencionais e, junto com TLR7, é altamente expresso em DCs plasmocitoides (pDC) (COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2004; LESTER; LI, 2014; WAGNER, 2004). A ativação de TLR9 recruta a via dependente de MyD88, levando à produção de IFN mediada por IRF7 (Figura 1b) ou de respostas pró-inflamatórias, com produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12,

por meio da translocação de NF- $\kappa$ B. Essas respostas diferenciais dependem do tipo de célula e, em pDCs, a produção rápida de IFNs tipo I é estimulada (LESTER; LI, 2014; LIU, 2005).

#### 1.4. Polimorfismos genéticos de genes do sistema imune inato

Polimorfismo genético é uma diferença na sequência de DNA entre indivíduos, grupos de indivíduos ou populações (ISMAIL; ESSAWI, 2012). Ocorre em situações em que mais de um alelo ocupa o mesmo *locus* de um determinado gene representante de uma população com uma frequência igual ou maior que 1% (KARKI *et al.*, 2015; RODRIGUES; NETO, 2019). Podem ser classificados em polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism - SNPs), repetições de sequência, inserções, deleções e recombinações (ISMAIL; ESSAWI, 2012).

SNPs são variações em nucleotídeos únicos em localizações genômicas específicas entre indivíduos da mesma espécie (ISMAIL; ESSAWI, 2012), ou seja, são substituições em um único par de bases (Figura 2) (KRUGLYAK; NICKERSON, 2001). SNPs são a forma mais comum de polimorfismo, surgindo a cada 1.000 pares de bases no genoma humano e são geralmente encontrados em áreas que flanqueiam genes codificadores de proteínas, mas também podem ocorrer em sequências codificadoras, íntrons ou em regiões intergênicas (KARKI *et al.*, 2015).



**Figura 2: Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em indivíduos da mesma espécie.** Exemplo de indivíduos de uma mesma espécie que possuem diferença em um único nucleotídeo em uma mesma região do DNA. Fonte: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Single-Nucleotide-Polymorphisms>.

SNPs podem ser considerados sinônimos ou silenciosos, quando não resultam em nenhuma alteração de aminoácidos, devido à redundância do código genético, ou não-sinônimos, quando resultam em um aminoácido distinto que pode ou não afetar a estrutura ou função da proteína (ISMAIL; ESSAWI, 2012; SKEVAKI *et al.*, 2015). SNP sem sentido é um SNP não-sinônimo e ocorre quando um códon de parada é formado, levando assim à terminação prematura de uma cadeia polipeptídica formando uma proteína truncada (ISMAIL; ESSAWI, 2012).

Polimorfismos em genes relacionados ao sistema imune são considerados importantes para a resistência ou suscetibilidade do hospedeiro a uma doença infecciosa (MUKHERJEE; TRIPATHI, 2019). SNPs são usados como assinaturas genéticas em populações para estudar a predisposição a certas características, incluindo doenças (KARKI *et al.*, 2015).

Mutações em genes da imunidade inata foram encontradas em 23 pacientes com pneumonia grave por Covid-19 (BASTARD *et al.*, 2022; ZHANG, QIAN *et al.*, 2020). Estudos sugerem uma associação entre SNPs em genes da imunidade inata e infecções virais. Por exemplo, um SNP no gene que codifica para a proteína quimiocina quimioatraente de monócitos 1 (monocyte chemoattractant protein-1 - MCP-1) foi associado à infecção pelo japonense encephalitis virus (JEV), podendo atuar como um marcador preditivo para o prognóstico adverso na população do nordeste da Índia (CHOWDHURY; KHAN, 2017). As 2'-5'-oligoadenilato sintetases (2',5'-oligoadenylate synthetase - OAS) são proteínas antivirais induzidas por IFN, e um SNP no gene *oas* foi identificado como um fator de risco para infecção inicial pelo West Nile virus (WNV) em homens (LIM *et al.*, 2009). Um SNP no gene que codifica para a proteína adaptadora contendo domínio TIR (TIR domain containing adaptor protein – TIRAP) foi associado ao aumento do risco de dengue grave (ALAGARASU *et al.*, 2015). Além disso, SNPs nos genes *myd88*, *tlr3* e *tlr7* foram repetidamente associados à sintomatologia grave em infecção pelo Rift Valley fever virus (HISE *et al.*, 2015).

Polimorfismos em *tlrs* podem influenciar a resposta imune, principalmente afetando as interações hospedeiro-patógeno. A frequência de polimorfismos de *tlr* e suas funcionalidades variam em diferentes regiões geográficas sendo a seleção natural considerada a principal causa dessa diversidade (MUKHERJEE; TRIPATHI, 2019).

## 1.5. Vírus

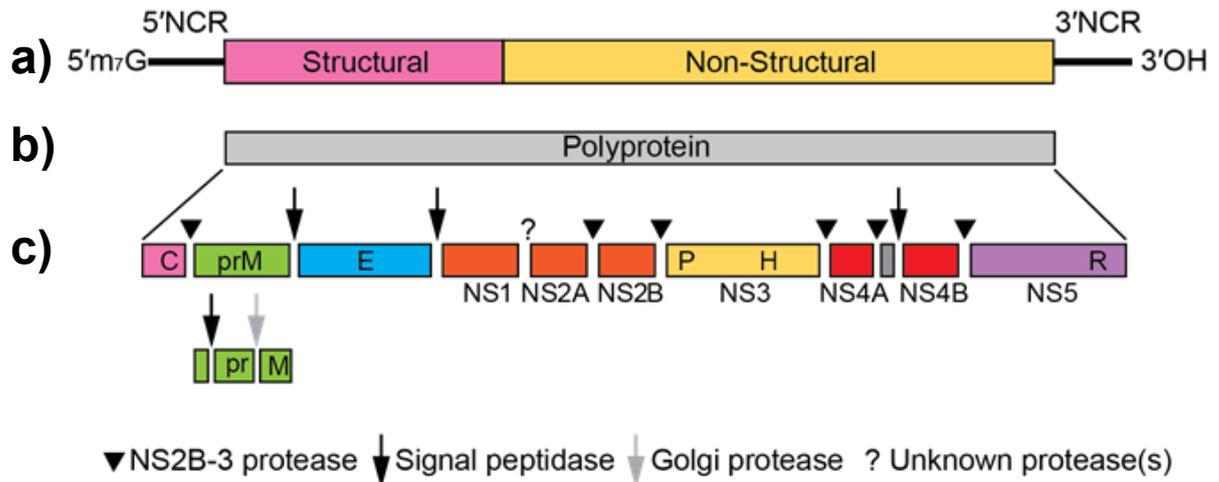
### 1.5.1. Flavivírus

Os flavivírus compõem um gênero da família *Flaviviridae*, segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). A maioria dos flavivírus são arbovírus, ou seja, vírus transmitidos por artrópodes (VON GIESEN, 2016). Este gênero pode ser classificado em três grandes grupos: (i) os vírus transmitidos por mosquitos como DENV, JEV, Saint Louis encephalitis virus (SLEV), WNV, yellow fever virus (YFV) e ZIKV; (ii) os vírus transmitidos por carrapatos, como o tick-borne encephalitis virus; (iii) vírus sem vetor artrópode conhecido, por exemplo, Tamana bat virus, transmitido entre roedores e morcegos. Usualmente, mamíferos e aves são os hospedeiros primários acometidos com infecções assintomáticas até quadros graves como as febres hemorrágicas e acometimentos neurológicos (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; SIMMONDS *et al.*, 2017).

Os flavivírus possuem 50 nm de diâmetro, não contêm espículas ou projeções de superfície, são compostos pelo envelope viral e por proteínas de membrana, incorporadas em uma bicamada lipídica derivada de células hospedeiras, a qual envolve um nucleocapsídeo, que ancora o RNA genômico (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015; KUHN *et al.*, 2002; PIERSON; DIAMOND, 2020; VON GIESEN, 2016).

O genoma dos flavivírus é composto por RNA fita simples (ssRNA) com polaridade positiva de aproximadamente 11 kb, que funciona como um RNA mensageiro (mRNA), com uma única janela aberta de leitura (open reading frames - ORF) (Figura 3a). O genoma é flanqueado nas extremidades 5' e 3' por regiões não codificantes (non-coding regions - NCR) (Figura 3a). Estas regiões 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).

Inicialmente, as proteínas virais são traduzidas em uma poliproteína (Figura 3b) 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 3c) (PIERSON; DIAMOND, 2020; ZHANG, Y. *et al.*, 2003).



**Figura 3: Organização do genoma e do processamento da poliproteína dos flavivírus.** (a) Genoma viral com as regiões codificadoras das proteínas estruturais (structural) e não estruturais (non-structural) e as regiões não codificadoras (5'NCR e 3'NCR). (b) Poliproteína (c) Clivagem da poliproteína 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 penetração 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 e é clivado durante a maturação da partícula viral (PIERSON; DIAMOND, 2020; SIMMONDS *et al.*, 2017).

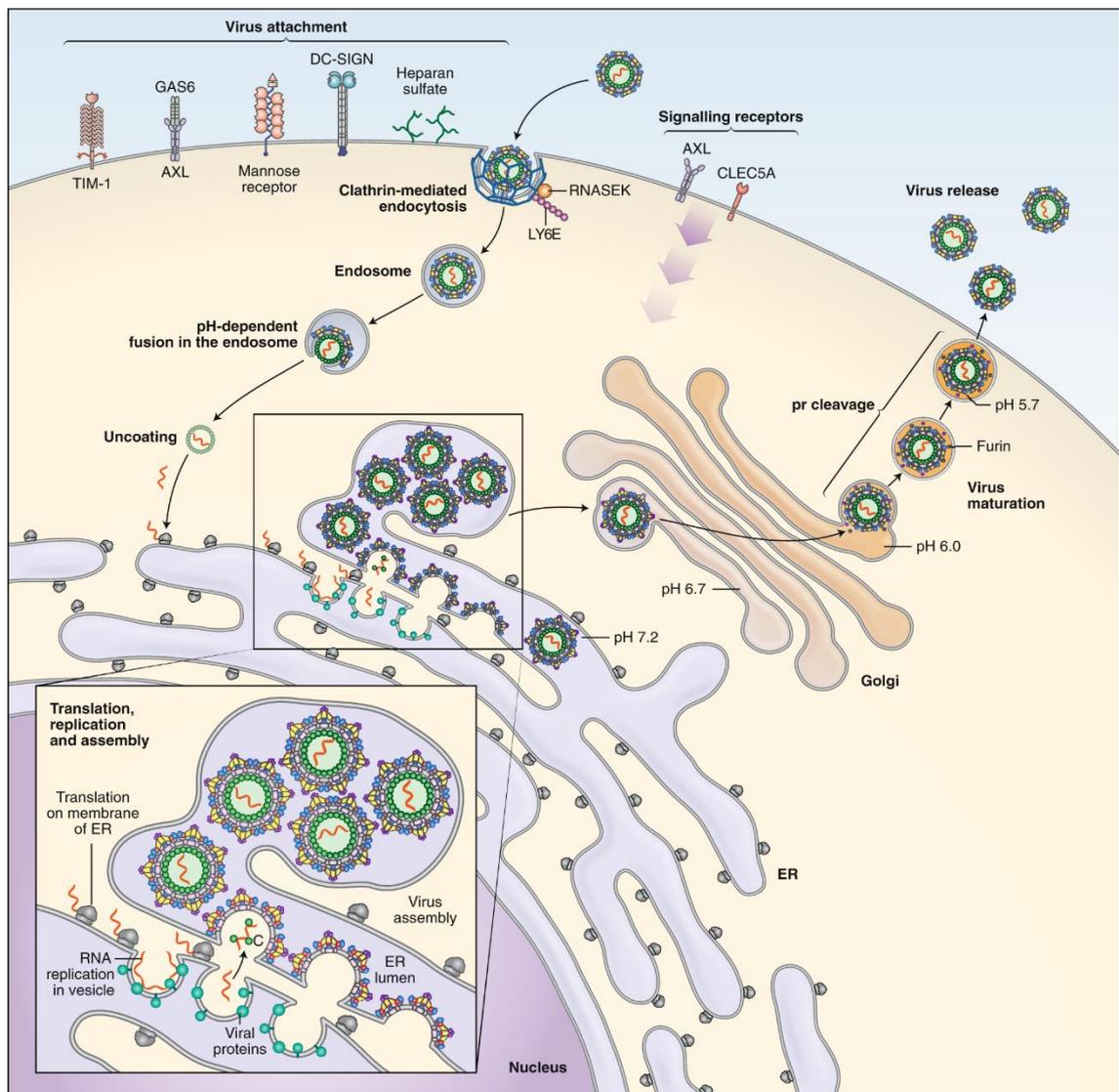
O ciclo de multiplicação dos flavivírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira. O vírus se liga à superfície da célula hospedeira por meio de interações entre a proteína E e seus receptores celulares específicos (KOSCHINSKI *et al.*, 2003; SELIGMAN; BUCHER, 2003). Após a ligação, a fusão e a penetração do vírus através da membrana por 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 nucleocapsídeo no citoplasma celular (Figura 4) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; VON GIESEN, 2016).

Uma vez liberado no citoplasma, o RNA viral 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 ocorre nas membranas intracelulares (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005) e se inicia com a síntese de um RNA intermediário, que serve como molde para a síntese do RNA genômico (Figura 4) (PIERSON; DIAMOND, 2020; VON GIESEN, 2016).

A montagem das partículas ocorre na superfície do retículo endoplasmático, quando as proteínas estruturais e o recém-sintetizado RNA brotam do lúmen do retículo (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). As partículas virais montadas nas vesículas possuem uma conformação heterodimérica composta pelas proteínas E e prM, o que impede a atividade de fusão da proteína do envelope (Figura 4) (PIERSON; DIAMOND, 2020; VON GIESEN, 2016).

As partículas virais imaturas 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. 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 celular sendo as partículas virais maduras liberadas por exocitose (Figura 4) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).



**Figura 4: Ciclo de multiplicação dos flavivírus.** O vírus se liga à superfície de uma célula hospedeira e penetra 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 (TGN) para o complexo de Golgi, onde são clivadas pela protease furina, originando as partículas virais maduras, que são liberadas da célula por exocitose (PIERSON; DIAMOND, 2020).

### 1.5.1.1. Transmissão e epidemiologia de ZIKV e DENV

ZIKV e DENV são arbovírus transmitidos pelas fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* (PETERSEN *et al.*, 2016; SCREATON *et al.*, 2015).

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 asiática foi a responsável pelo surto de ZIKV nas Ilhas do Pacífico e nas Américas (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 foi identificado pela primeira vez em 1947, isolado de um macaco *Rhesus*, na Floresta de Ziika, em Uganda (DICK, 1952). A primeira infecção humana foi relatada na Nigéria, em 1954 (MACNAMARA, 1954). Até recentemente considerava-se que o ZIKV causava infecções de evolução benigna e esporádica 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 ZIKV fora da África e Ásia (WHO, 2015). E em 2013-2014, o ZIKV causou uma grande epidemia na Polinésia Francesa, antes de se disseminar 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, pela primeira vez, foi relacionado com os casos de microcefalia onde surto de Zika 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).

Após o surto em 2015/2016, pelo menos duas ondas menores associadas ao ZIKV foram relatadas em 2017 e 2018, em duas regiões brasileiras geograficamente distantes e climaticamente diferentes, Sudeste e Norte (DE MATOS *et al.*, 2021; GIOVANETTI *et al.*, 2020; IANI *et al.*, 2021). Esses surtos esporádicos destacam a circulação contínua do vírus, apesar da redução considerável na incidência da doença (DE MATOS *et al.*, 2021).

O DENV possui quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), cada um com vários genótipos e todos são capazes de causar a doença branda e a dengue grave (GREEN *et al.*, 2015). Os quatro sorotipos e os mosquitos vetores estão presentes em todas as regiões tropicais e subtropicais (KRAEMER *et al.*, 2015; MESSINA *et al.*, 2014; SHARP *et al.*, 2017).

A incidência da dengue ocorre nas regiões do Mediterrâneo Oriental, América, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e África, com novos casos ocorrendo e se disseminando para as áreas não endêmicas nos Estados Unidos e Europa (GUZMAN *et al.*, 2016). Esta expansão geográfica resultou no aumento da frequência e da magnitude das epidemias e doença grave (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015). Os viajantes desempenham um papel importante na epidemiologia global da dengue, transportando vírus de uma região para outra (JENSENIUS *et al.*, 2013; WHO, 2009).

No Brasil, diferentes sorotipos de DENV causaram epidemias nos últimos 20 anos, com surtos em 2002, 2008, 2010, 2012-2013, 2015 e 2016 (A DELINO *et al.*, 2021; BRASIL 2019). Em 2019, com a reemergência de DENV-2, aconteceu mais uma epidemia. Em 2021, segundo o boletim epidemiológico 36, ocorreram 477.209 casos prováveis de dengue, com 3.731 casos de dengue com sinais de alarme, 303 casos de dengue grave e 199 óbitos (BRASIL 2021).

#### **1.5.1.2. Manifestações clínicas e patogênese de ZIKV e DENV**

A infecção aguda por flavivírus em humanos varia de doença leve, com infecção assintomática ou episódios febris autolimitados, a doença grave, com febre hemorrágica, choque, encefalite, paralisia, defeitos congênitos, hepatite, insuficiência hepática e risco de vida. Aproximadamente 50-80% das infecções por flavivírus são assintomáticas e a maioria das infecções sintomáticas resultam em doenças febris autolimitadas semelhantes à gripe, com dor de cabeça, mialgia, artralgia e erupção cutânea, sem consequências a longo prazo (PIERSON; DIAMOND, 2020). Os fatores que determinam a ocorrência da doença mais grave não são totalmente caracterizados, mas provavelmente incluem polimorfismos em genes do hospedeiro (SAKUNTABHAI *et al.*, 2005), idade (MURRAY *et al.*, 2006), estado imunológico e comorbidades, imunidade prévia a outros flavivírus e patogenicidade diferencial de determinadas amostras de vírus (PIERSON; DIAMOND, 2020).

A variabilidade na apresentação da doença entre os flavivírus provavelmente reflete o tropismo celular e tecidual único de cada vírus, as diferenças em sua capacidade de evadir ou antagonizar a resposta imune do hospedeiro e a interação entre os efeitos patogênicos diretos da infecção pelo vírus e a lesão causada pela resposta imune do hospedeiro (PIERSON; DIAMOND, 2020).

As infecções por flavivírus se enquadram em duas grandes categorias, viscerais e neurotrópicas, embora algumas tenham ambas as características como ZIKV (PIERSON; DIAMOND, 2020). A maioria das infecções por ZIKV são assintomáticas, e ocorre uma doença leve, autolimitada com um período de incubação de até 10 dias. Enquanto a maioria dos casos de infecção por ZIKV em humanos possuem 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 autoimune, 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), podendo provocar paralisia aguda ou subaguda, causando a morte (SAIZ, 2016). Durante este surto na Polinésia Francesa, a incidência da síndrome de Guillain-Barré aumentou vinte vezes (OEHLER *et al.*, 2014). Da mesma maneira, durante o surto na Colômbia, 86 casos de síndrome de Guillain-Barré foram associados à infecção por ZIKV (SAIZ, 2016).

O surto de ZIKV no Brasil mostrou pela primeira vez uma possível ligação entre a infecção por ZIKV e 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 2.000 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). Depois desta descoberta, pesquisadores da Polinésia Francesa revisaram amostras armazenadas de líquido amniótico de casos com anomalia fetal cerebral e microcefalia, descobrindo que quatro de cada cinco amostras eram positivas 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). Muitos trabalhos utilizando murinos forneceram evidências que confirmaram a relação entre ZIKV e microcefalia fetal e 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 foi relatada no Brasil (GOURINAT *et al.*, 2015). Essas infecções congênitas 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). O RNA genômico também foi detectado em líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças infectadas com manifestações neurológicas (MARINHO, 2019; MARINHO; KROON, 2019; MARINHO *et al.*, 2019).

Vários modelos murinos foram desenvolvidos para estudar aspectos específicos da infecção por flavivírus, tanto para induzir a doença semelhante à humana em camundongos imunocompetentes como para imitar a doença humana em camundongos imunodeficientes. No entanto, nenhum deles recria todo o espectro da doença em humanos (VAN LEUR *et al.*, 2021). Foi demonstrado que proteínas NS5 de ZIKV e DENV interagem com a proteína STAT2 humana promovendo sua degradação (ASHOUR *et al.*, 2009; GRANT *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020) ou impedindo sua ligação a elementos promotores de genes alvo (LAURENT-ROLLE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2020). Porém, em camundongos isto não foi reproduzido, o que em parte explica por que camundongos imunocompetentes não são suscetíveis a esses vírus (VAN LEUR *et al.*, 2021).

Quanto a modelos de infecção para ZIKV, o primeiro vírus isolado, denominado MR766, foi multiplicado em série em cérebro de camundongos mais de 100 passagens (DICK, 1952a). A inoculação por via intracraniana (IC) da MR766 quando inoculada em camundongos lactentes ou adultos causou doença neurológica (DICK, 1952b; MORRISON; DIAMOND, 2017). Porém, quando a inoculação não é feita por via IC, a infecção de camundongos adultos imunocompetentes com ZIKV MR766 não causa doença (BRADLEY; NAGAMINE, 2017; LAZEAR *et al.*, 2016; MORRISON; DIAMOND, 2017; ROSSI *et al.*, 2016). No entanto, camundongos C57BL/6 com um dia de idade inoculados por via subcutânea com ZIKV PRVABC59, uma amostra

isolada de Porto Rico, desenvolveram marcha instável com postura ampliada, hiperatividade e ataxia duas semanas após a infecção, seguido por mobilidade reduzida, colapso alternado intermitente dos membros posteriores, perda de equilíbrio e convulsões. Além disso, esses camundongos apresentaram níveis detectáveis de RNA genômico no SNC (DONG; LIANG, 2018; MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

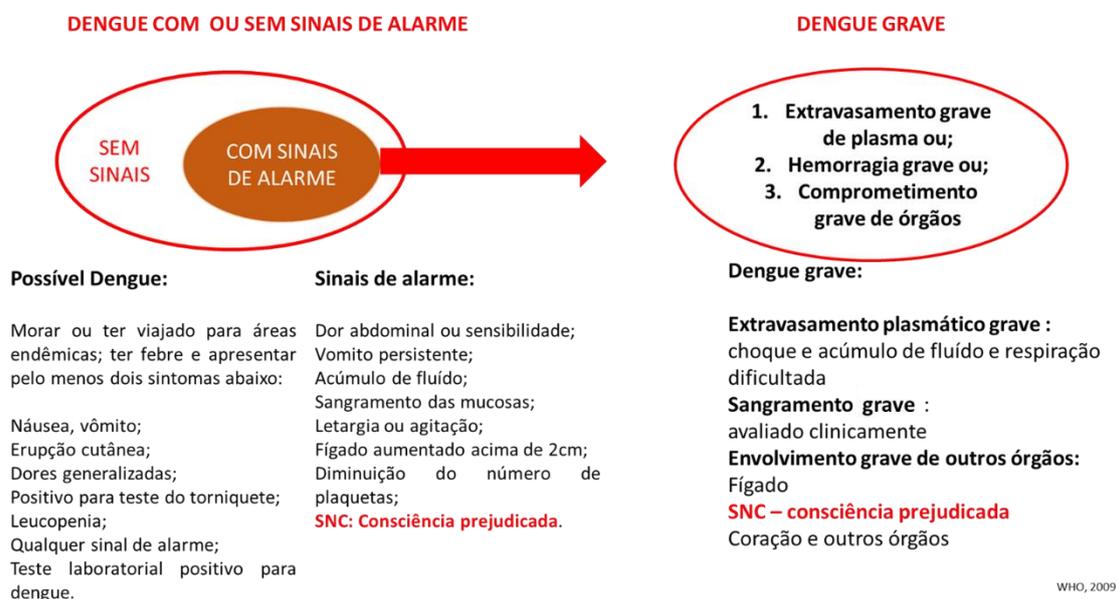
Camundongos imunodeficientes para receptores de IFN do tipo I, como A129, ou duplo nocaute para receptores de IFN do tipo I e II, como AG129, infectados por via periférica com ZIKV desenvolvem sinais de doença, como perda de peso, letargia, postura encurvada, eriçamento de pelos e podem evoluir para óbito (ALIOTA *et al.*, 2016; BRADLEY; NAGAMINE, 2017; DOWALL *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016; ZMURKO *et al.*, 2016). Outros camundongos imunodeficientes, como 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 apresentaram formações corticais malignas, indicativas de microcefalia (CUGOLA *et al.*, 2016).

Dengue é considerada uma doença visceral (PIERSON; DIAMOND, 2020), o neurotropismo do vírus era considerado uma característica oportunista, mas cada vez mais evidências apoiam fortemente que DENV é diretamente neurovirulento (LI *et al.*, 2017; MARINHO; KROON, 2019; MARINHO *et al.*, 2017, MARINHO *et al.*, 2021). A capacidade de DENV de infectar o SNC tem sido demonstrada através da detecção de imunoglobulina anti-DENV, RNA viral ou NS1 e isolamento do vírus em LCR (LI, *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2017, MARINHO *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SAHU *et al.*, 2014; SOLBRIG; PERNG, 2015). Encefalite e encefalopatia são as apresentações neurológicas mais comuns da infecção por DENV (LI, G. H. *et al.*, 2017).

DENV infecta principalmente células imunes de linhagem mielóide, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, e possivelmente hepatócitos e células endoteliais (GREEN *et al.*, 2014). A dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas, muitas vezes com evoluções clínicas imprevisíveis. 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 autolimitada (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, desordens neurológicas, miocardites e hemorragia grave sem vazamento de plasma ou choque (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Como demonstrado na Figura 5, segundo recomendações da WHO, os pacientes com dengue não grave são divididos em dois grupos: dengue sem sinais de alarme e dengue com sinais de alarme. Mesmo pacientes sem sinais de alarme podem evoluir para a doença grave. Os órgãos acometidos pela dengue grave são o fígado, com aumento de transaminases, o coração, o CNS, com consciência prejudicada, e outros órgãos (Figura 5) (WHO, 2009).



**Figura 5: Classificação de casos de dengue e níveis de gravidade (WHO, 2009).**

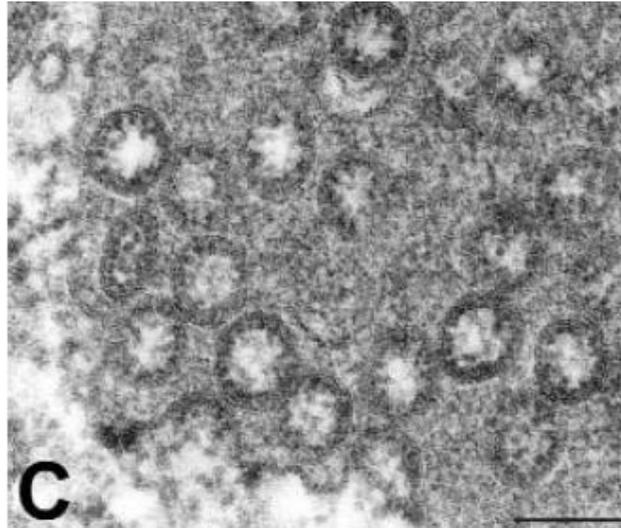
Ainda não existe tratamento antiviral específico para DENV ou ZIKV (GREEN *et al.*, 2015; KAZMI *et al.*, 2020). Para ZIKV, apesar de não existir nenhuma vacina aprovada, existem pelo menos 13 candidatos vacinais, que se mostraram promissores em vários modelos animais e vários já entraram em ensaios clínicos de fase I/II em humanos. No entanto, uma avaliação mais aprofundada dessas vacinas candidatas

em ensaios clínicos em humanos parece improvável, principalmente devido à falta de financiamento, aos altos custos financeiros associados a esses estudos e aos níveis incertos de lucro para as empresas do setor privado (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020).

Para DENV existe uma vacina aprovada, Dengvaxia, desenvolvida pela Sanofi Pasteur. A vacina foi construída com tecnologia de DNA recombinante, que substitui várias sequências genéticas no genoma de um vírus vacinal contra a febre amarela pelas sequências homólogas dos quatro sorotipos do vírus da dengue, sendo assim tetravalente. Porém, a vacina só é indicada para indivíduos soropositivos para dengue na faixa etária de 9 a 45 anos em países com dengue endêmica (IZMIRLY *et al.*, 2020; THOMAS; YOON, 2019).

### **1.5.2. Betacoronavírus**

O gênero *Betacoronavirus* pertence à família *Coronaviridae*, sub-família *Orthocoronavirinae*. Os membros da família *Coronaviridae* são vírus de ssRNA de polaridade positiva, contendo aproximadamente 26.000 a 32.000 bases. As partículas virais são envelopadas, esféricas, com diâmetro de 120 a 160 nm. Os vírus possuem projeções de superfície em forma de clava ou pétala, que criam uma imagem em microscopia eletrônica que lembra a coroa solar, o que inspirou o nome coronavírus (Figura 6) (GOLDSMITH *et al.*, 2004; ICTV, 2011, 2020). Os coronavírus infectam aves, humanos e outros mamíferos, incluindo gado e animais domésticos, e, portanto, não são apenas um desafio para a saúde pública, mas também uma preocupação veterinária e econômica (V'KOVSKI *et al.*, 2021).



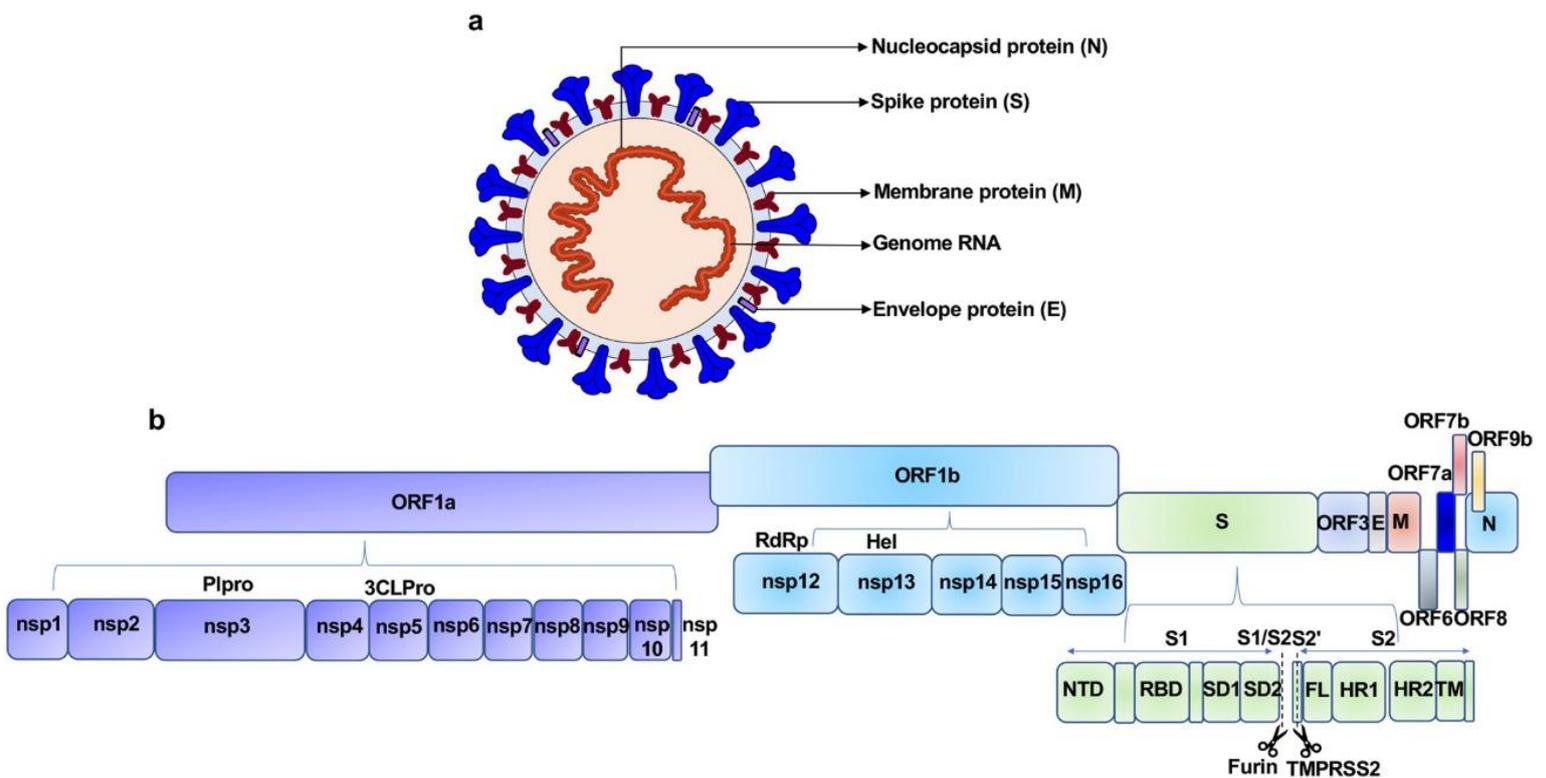
**Figura 6: Partículas de SARS-CoV observadas por microscopia eletrônica (MET)** Aumento de 100nm. (GOLDSMITH *et al.*, 2004) (*adaptado*).

Os coronavírus são os maiores vírus de RNA identificados até agora. O genoma viral é composto de regiões terminais 5' e 3'. A região terminal 5' constitui a maior parte do genoma e contém ORFs que codificam proteínas responsáveis pela multiplicação viral. ORF1a e ORF1b são as principais, abrangendo dois terços do genoma, e são traduzidas para proteínas pp1a e pp1b. O genoma do vírus codifica duas proteases de cisteína, uma protease semelhante à papaína (PLpro), ou nsp3, e uma protease semelhante a 3C (3CLpro), ou nsp5. Essas proteases clivam os polipeptídeos pp1a e pp1b em 16 proteínas não estruturais (Figura 7b) (ICTV, 2011; UMAKANTHAN *et al.*, 2020; VAN DER HOEK *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2020; ZHANG, QIANQIAN *et al.*, 2021).

A região terminal 3' codifica para as proteínas estruturais: spike (S), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e envelope (E) (Figura 7a).

A proteína S tem duas subunidades principais, S1 e S2 (Figura 7b). A subunidade S1 desempenha um papel no reconhecimento e ligação do receptor, enquanto a subunidade S2 ancorada na membrana e faz a mediação da fusão das membranas viral e da célula hospedeira e são os principais indutores de anticorpos neutralizantes. A subunidade S1 consiste em dois domínios estruturais bem definidos, o domínio de ligação ao receptor (RBD) e o domínio tipo galectina N-terminal (NTD) e em dois subdomínios, 1 (SD1) e 2 (SD2) (Figura 7b). A subunidade S2 possui quatro regiões estruturais conservadas, um peptídeo de fusão, duas repetições heptadas (HR1, HR2) e uma região transmembrana (TM) (Figura 7b) (ARYA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

A proteína estrutural N forma complexos de RNA que auxiliam na transcrição e montagem do vírus (Figuras 7a e b). A proteína M é a proteína estrutural mais abundante e define a forma do envelope viral (Figuras 7a e b). A proteína E é a menor das principais proteínas estruturais e é altamente expressa dentro da célula infectada durante o ciclo de multiplicação viral (Figuras 7a e b). Distribuídas entre os genes estruturais há proteínas acessórias, como ORF3, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF9b (Figura 7b) (ICTV, 2011, 2020; UMAKANTHAN *et al.*, 2020; VAN DER HOEK *et al.*, 2004).



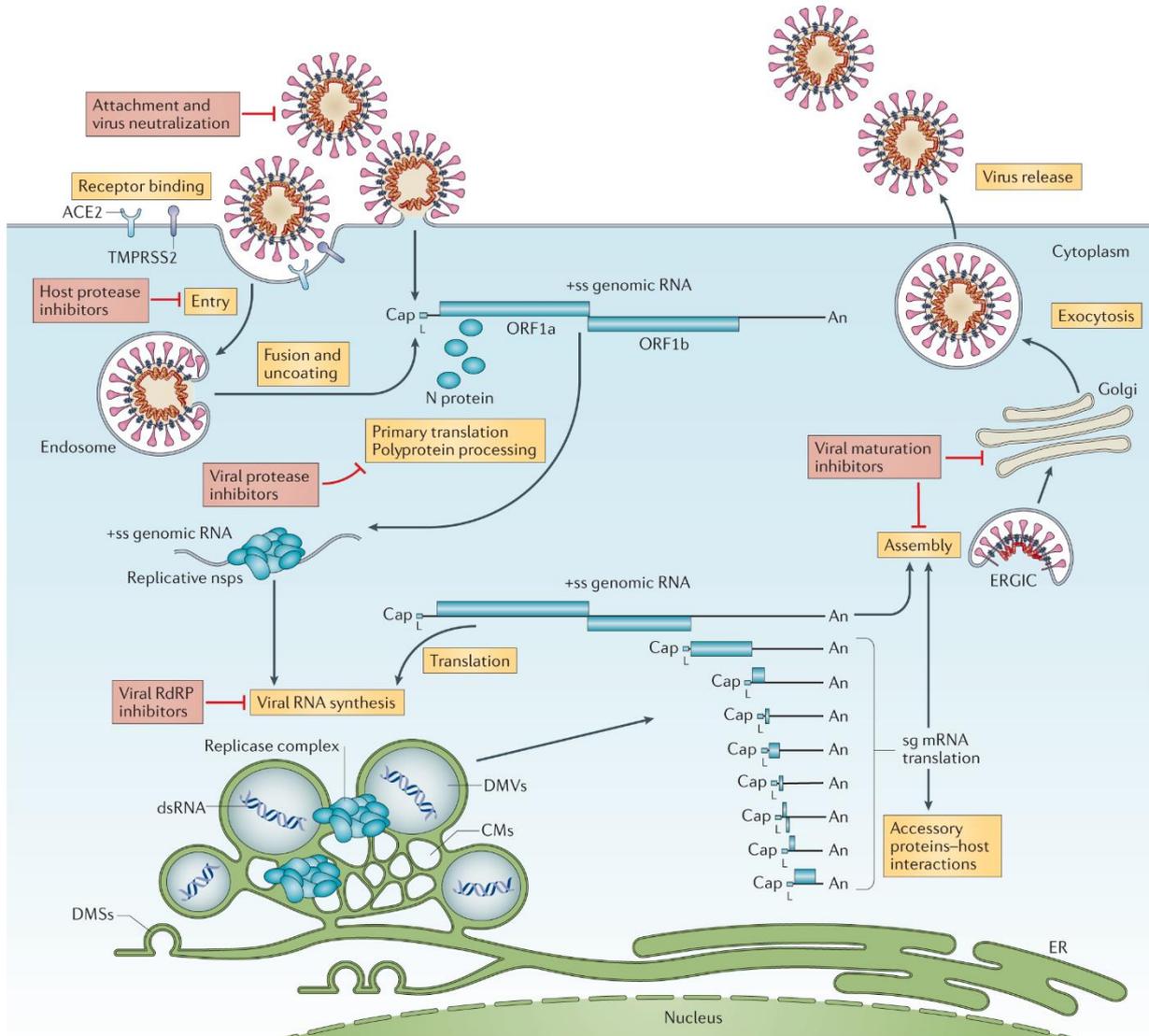
**Figura 7: Desenho esquemático representativo da estrutura da partícula viral e do genoma dos coronavírus.** **a)** Estrutura da partícula viral: o corte transversal indica por linhas a proteína de envelope (roxo), a proteína de membrana (vermelho), a proteína espícula (azul) e a proteína do nucleocapsídeo (laranja) envolvendo o RNA. **b)** Genoma viral: inclui ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a e 7b)-ORF8-ORF9b-N, nesta ordem. Dezesesseis proteínas não estruturais (nsp1-11, 12-16) são codificadas por ORF1a e ORF1b, respectivamente. Seis proteínas acessórias foram delineadas Plpro, 3CLPro, RdRp, Hel, S1, S2. A linha pontilhada indica a clivagem do sítio S1/S2 e S2' por Furina e TMPRSS2. Plpro - papain like protease, 3CLPro - 3C-like proteinase, RdRp - RNA-dependent RNA polymerase, Hel - Helicase, S encode NTD N-terminal domain, RBD - receptor-binding domain, SD1 - subdomain 1, SD2 - subdomain 2, FL - fusion loop, HR1 - heptad repeat 1, HR2 - heptad repeat 2, TM - transmembrane domain (ZHANG *et al.*, 2021).

Para a multiplicação, o vírus penetra na célula hospedeira por fusão direta do envelope viral com a membrana da célula, ou fusão de membrana dentro do endossomo após a endocitose. A penetração é iniciada pela ligação do RBD da

proteína S aos receptores da célula hospedeira humana na superfície da célula. Após a interação com o receptor RBD, a proteína S sofre clivagem proteolítica, sendo catalisada por várias proteases do hospedeiro, como furina, serinoprotease transmembrana II humana (TMPRSS2) e catepsina B/L. O processamento proteolítico ativa a proteína S permitindo a fusão das membranas viral e da célula hospedeira para a liberação do RNA viral no citoplasma da célula (ZHANG, QIANQIAN *et al.*, 2021).

O complexo de replicação do RNA viral é codificado em aproximadamente dois terços do genoma, que inclui genes das 16 proteínas não estruturais, expressas por PP1a e PP1ab, a partir das ORF1a e ORF1b, respectivamente. O complexo de replicação produz o genoma para replicação e tradução, além de RNA subgenômicos que servem como RNAs mensageiros (RNAm). As proteínas estruturais S, M e E são clivadas e inseridas na membrana do retículo endoplasmático, seguindo a via secretora do compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi (ERGIC). O genoma do RNA então se associa à nucleoproteína (N) e depois, por brotamento, migra para o ERGIC, finalizando a montagem das partículas virais. Após esta etapa

os vírus são transportados para a superfície celular em vesículas e são liberados por exocitose (AMANAT; KRAMMER, 2020; FEHR; PERLMAN, 2015).



**Figura 8: Ciclo de multiplicação dos coronavírus.** Partículas virais maduras podem se ligar a um grupo de receptores celulares, aderindo à célula do hospedeiro. Ocorre a internalização dos vírus após interação do domínio de ligação de receptor e consequente fusão das membranas viral e do endossomo, engatilhada no baixo pH, promovendo o desnudamento da partícula e liberação do genoma para o citoplasma. O RNA é traduzido e poliproteínas são processadas por proteases virais e celulares do hospedeiro. Proteínas não estruturais do vírus realizam a replicação do genoma e, em seguida, o RNA recém-sintetizado se associa à proteína de nucleocapsídeo. A montagem da partícula ocorre, seguindo a via secretora do compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi (ERGIC). As partículas virais são transportadas em vesículas para a superfície celular e liberadas por exocitose (V'KOVSKI et al., 2021).

### 1.5.2.1. Transmissão e epidemiologia

Coronavírus são disseminados entre aves e mamíferos, e possuem morcegos como o principal reservatório evolutivo e impulsionadores ecológicos da diversidade destes vírus (LI, *et al.*, 2005; UMAKANTHAN *et al.*, 2020). São transmitidos geralmente de indivíduo a indivíduo por gotículas expiradas, por aerossóis, superfícies contaminadas e via oral-fecal (ABRAHÃO *et al.*, 2021; ONG *et al.*, 2020). Tosse, espirro, inalação de gotículas, contato com as mucosas oral, nasal e ocular são as formas comuns de disseminação do vírus. A transmissão de humano para humano ocorre por via direta, por contato, transmissões aéreas por meio de aerossóis e durante procedimentos médicos. (LI, *et al.*, 2020; UMAKANTHAN *et al.*, 2020).

Os coronavírus não eram considerados altamente patogênicos para humanos até 2002, quando ocorreu o surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS), na província de Guangdong, China. Antes deste surto, os coronavírus que circulavam em humanos causavam principalmente infecções leves em pessoas imunocompetentes (CUI; LI; SHI, 2019; DROSTEN *et al.*, 2003; ZHONG *et al.*, 2003). Dez anos depois, em 2012, outro coronavírus altamente patogênico, o coronavírus da Middle East respiratory syndrome (MERS) surgiu nos países do Oriente Médio (CUI; LI; SHI, 2019; ZAKI *et al.*, 2012).

Em 31 de dezembro de 2019, ocorreu o primeiro caso de infecção por um novo coronavírus, nomeado de SARS-CoV-2, em Wuhan, China, com a apresentação de sintomas de pneumonia atípica (WU, *et al.*, 2020; ZHOU, *et al.*, 2021). A doença causada pelo coronavírus 2019 (Covid-19) é uma ameaça emergente à saúde global, a epidemia começou na cidade de Wuhan em 2019 e desde então se disseminou rapidamente pelo mundo (UMAKANTHAN *et al.*, 2020). A disseminação da Covid-19 em todo o mundo está associada às viagens, que causaram a propagação da doença regional e globalmente (LI *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2021). Em 11 de março de 2020, a OMS declarou o surto de Covid-19 como uma pandemia (UMAKANTHAN *et al.*, 2020; WHO, 2020a). Atualmente, SARS-CoV-2 está presente em todos os países do mundo e, segundo o Painel de Controle da WHO, acessado em fevereiro de 2022, já causou mais de 430 milhões de casos confirmados e mais de 5 milhões de óbitos. Estados Unidos, Índia e Brasil são os países mais afetados, ocupando o primeiro, segundo e terceiro lugares, respectivamente, em números de casos (WHO, 2022).

### 1.5.2.2. Manifestações clínica e patogênese

Os coronavírus causam infecções respiratórias e intestinais em animais e humanos (CUI; LI; SHI, 2019). Em humanos, podem causar uma variedade de infecções do trato respiratório, variando de resfriado leve a síndrome respiratória grave (UMAKANTHAN *et al.*, 2020; WHO, 2020b).

Os coronavírus humanos, como o alphacoronavirus HCoV-229E e o betacoronavirus HCoV-OC43, circulam na população e, juntamente com os mais recentemente identificados alphacoronavirus HCoV-NL63 e o betacoronavirus HCoV-HKU1, causam infecções sazonais e geralmente leves do trato respiratório, associadas a sintomas de resfriado comum. Ao contrário, os betacoronavirus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, que surgiram na população humana nos últimos 20 anos, são altamente patogênicos. Ao infectar células epiteliais brônquicas, pneumócitos e células do trato respiratório superior em humanos, as infecções por estes vírus podem evoluir para doenças respiratórias graves, com lesões pulmonares e risco de vida (V'KOVSKI *et al.*, 2021).

Covid-19, que tem como agente etiológico o SARS-CoV-2, é uma doença na qual os sintomas podem se iniciar de 2 a 14 dias após a exposição ao vírus e qualquer pessoa pode ter sintomas de leves à graves. Os sintomas mais comuns são febre, calafrios, tosse, falta de ar, dificuldade em respirar, fadiga, dores musculares ou no corpo, dor de cabeça, perda de paladar ou olfato, dor de garganta, congestão ou corrimento nasal, náusea ou vômito e diarreia. Os sinais de alerta são dificuldade em respirar, dor ou pressão persistente no peito, confusão, incapacidade de acordar ou ficar acordado e pele, lábios ou leito ungueal pálido, cinza ou azulado, dependendo do tom da pele (CDC, 2021b).

Ao se ligar às células epiteliais no trato respiratório, o SARS-CoV-2 começa a multiplicar, dissemina para as vias aéreas e penetra nas células epiteliais alveolares nos pulmões. A rápida multiplicação nos pulmões pode desencadear uma forte resposta imune, com tempestade de citocinas, que causam a síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência respiratória, que é considerada a principal causa de morte em pacientes com Covid-19 (HU *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2020; MEHTA *et al.*, 2020). Pacientes com mais de 60 anos e com doenças pré-existent graves têm

maior risco de desenvolver síndrome do desconforto respiratório agudo e morte (HU *et al.*, 2021; LIU, *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020).

A Covid-19 pode ser dividida em fase inicial ou início da infecção, fase intermediária ou pulmonar e fase hiperinflamatória ou grave, de acordo com a gravidade e progressão do quadro clínico de cada indivíduo (SIDDIQI; MEHRA, 2020). Na fase inicial, o vírus infecta células epiteliais principalmente do trato respiratório superior, nas regiões da nasofaringe e orofaringe, com sintomas inespecíficos comuns, como febre e dores de cabeça. Neste estágio o vírus pode seguir uma via alternativa, infectando neurônios e bulbo olfatórios, usualmente associado às perdas de sensibilidade olfativa e palativa, podendo alcançar a região encefálica, com possível acometimento do SNC e evidências de sinais neurológicos na fase intermediária (LI; XUE; XU, 2020).

Na fase intermediária, o vírus infecta células do trato respiratório inferior, levando a evolução dos sintomas respiratórios, com acometimento pulmonar intenso. Assim, a doença pode progredir de casos leves para casos mais graves, em que o estado imune não é mais capaz de controlar o processo inflamatório, apresentando lesões e comprometimento de tecidos. Ocorre uma intensa resposta imune, com recrutamento de leucócitos e infiltrado inflamatório, com tempestade de citocinas, levando a processos de piroptose, extravasamento celular, aumento da permeabilidade vascular e edema intenso, promovendo ainda mais a resposta inflamatória e o agravamento do quadro clínico, associados aos sinais de pneumonia, como dispneia e hipóxia tecidual (SHI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

A doença pode evoluir para uma síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e, associado à fase pulmonar mais grave, iniciar um processo de sepse viral desencadeado na viremia, culminando em um efeito responsivo sistêmico e acometendo, por exemplo, os tecidos cardíaco, renal e hepático. Esse agravamento resulta no estágio hiperinflamatório, usualmente caracterizado por uma lesão tecidual pulmonar extensa e associado à insuficiência cardíaca, podendo acarretar, por exemplo, em uma síndrome coronariana aguda, miocardites, falência renal e parada cardiorrespiratória, até a morte do indivíduo (LI, HUI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

Crianças infectadas com SARS-Cov-2 podem apresentar a síndrome inflamatória multissistêmica pediátrica (SIMP), uma condição em que diferentes partes do corpo podem ficar inflamadas, incluindo o coração, pulmões, rins, cérebro, pele, olhos ou órgãos gastrointestinais. Os sintomas que caracterizam a SIMP são febre contínua com um ou mais dos seguintes sintomas: dor de estômago, olhos vermelhos, diarreia, tonturas ou vertigens (sinais de pressão arterial baixa), erupção cutânea, vômito (CDC, 2021a; HARWOOD; ALLIN; JONES; WHITTAKER; RAMNARAYAN; YARDLEY; et al., 2021; WHITTAKER et al., 2020). As crianças podem apresentar doença de Kawasaki, síndrome do choque tóxico, sepse viral e, menos comumente, síndrome de ativação de macrófagos ou linfocitose hemofagocítica (HARWOOD et al., 2021; LI et al., 2020; RIPHAGEN et al., 2020; VINER; WHITTAKER, 2020; WHITTAKER et al., 2020).

A infecção por SARS-CoV-2 já foi associada a uma variedade de complicações neurológicas, mas o espectro dessas complicações neurológicas não é totalmente compreendido (BAUER et al., 2022; MISRA et al., 2021; Romero-Sánchez et al., 2020). Estas complicações incluem anosmia, eventos cerebrovasculares, estado mental alterado, neuropatias periféricas, encefalopatias e complicações neurológicas e psiquiátricas que podem durar até 6 meses após o início dos sintomas, como hemorragia intracraniana, parkinsonismo, comprometimento cognitivo e distúrbio do sono (BAUER et al., 2022; Blomberg et al., 2021; Chou et al., 2021; Taquet et al., 2021; Varatharaj et al., 2020). Ainda falta uma compreensão abrangente da patogênese das sequelas neurológicas do SARS-CoV-2, mas, os possíveis mecanismos que podem contribuir para a patogênese incluem hipóxia, danos imunomediados, problemas de coagulação e invasão viral no SNC (BAUER et al., 2022; Jafari Khaljiri et al., 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

A emergência e reemergência de vários vírus, em conjunto com a globalização, através do transporte de pessoas e mercadorias, levam a expansão das infecções virais, causando epidemias e pandemias, sendo essas, um grave problema de saúde pública mundial, com impacto social e econômico.

ZIKV, DENV e SARS-CoV-2 são vírus de grande importância médica, que causaram ou continuam causando epidemias e pandemias, com altas taxas de mortalidade e morbidade. ZIKV foi identificado como responsável por causar microcefalia e outras malformações congênitas, além de síndrome de Guillain-Barré e distúrbios neurológicos. DENV pode causar dengue grave com extravasamento de plasma, hemorragias, comprometimento de órgãos, incluindo o SNC. SARS-CoV-2 vem causando uma pandemia, com mais de 500 milhões de casos confirmados e mais de 6 milhões de óbitos. No Brasil, ZIKV e DENV são endêmicos e SARS-CoV-2 também pode se tornar endêmico, sendo assim grandes problemas para o sistema de saúde pública.

Estudar os mecanismos de interação vírus-hospedeiro, principalmente a resposta imune frente à infecção viral é essencial para a compreensão da patogênese, do desenvolvimento e desfecho da doença. Como o sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro nas infecções virais, possui um papel crucial na defesa, reconhecendo os vírus, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e induzindo a resposta imune adaptativa. Por outro lado, uma resposta imune exacerbada e descontrolada nas infecções virais, pode causar danos celulares e teciduais ao hospedeiro.

No sistema imune inato os TLRs são os receptores responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, como os vírus. Após a detecção dos patógenos, os TLRs ativam fatores de transcrição, através da cascata de sinalização, que induzem respostas inflamatórias, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

Assim a motivação para este estudo foi avaliar em modelo *in vitro* e *in vivo* a interação de duas amostras de ZIKV isoladas no Brasil, com o hospedeiro estudando os TLRs ou elementos da via de sinalização do sistema imune inato. O impacto desta

interação foi avaliado ao comparar diferentes amostras e verificar diferenças biológicas.

Adicionalmente, para avaliar os fatores do hospedeiro relacionados à infecção viral, nosso estudo avançou analisando polimorfismos em genes da resposta imune inata, principalmente fatores relacionados à via de TLRs, em crianças infectadas com flavivírus e com manifestações clínicas de sistema nervoso central e em crianças com quadros graves de Covid-19.

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de receptores do tipo toll (TLRs) na resposta imune inata a infecções por ZIKV, DENV e SARS-CoV-2.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ativação de TLR2 e TLR4 em sistema *in vitro* por amostras de ZIKV isoladas no Brasil (PE243 e SPH);
- Comparar *in vivo* a susceptibilidade e a variação percentual de peso em camundongos imunocompetentes e nocautes para MyD88, TLR2/9 e NOS2 infectados com as diferentes amostras de ZIKV (PE243 e SPH) isoladas no Brasil;
- Quantificar citocinas e avaliar a distribuição do vírus em órgãos de camundongos imunocompetentes e MyD88<sup>-/-</sup> infectados via intracraniana com as diferentes amostras de ZIKV (PE243 e SPH) isoladas no Brasil;
- Avaliar a presença de SNPs nos genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *myd88*, *oas3* e *mcp-1* em DNA de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV e DENV e em crianças hospitalizadas infectadas com SARS-CoV-2
- Mensurar o nível de citocinas e quimiocinas em LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV e DENV;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Estratégias de trabalho

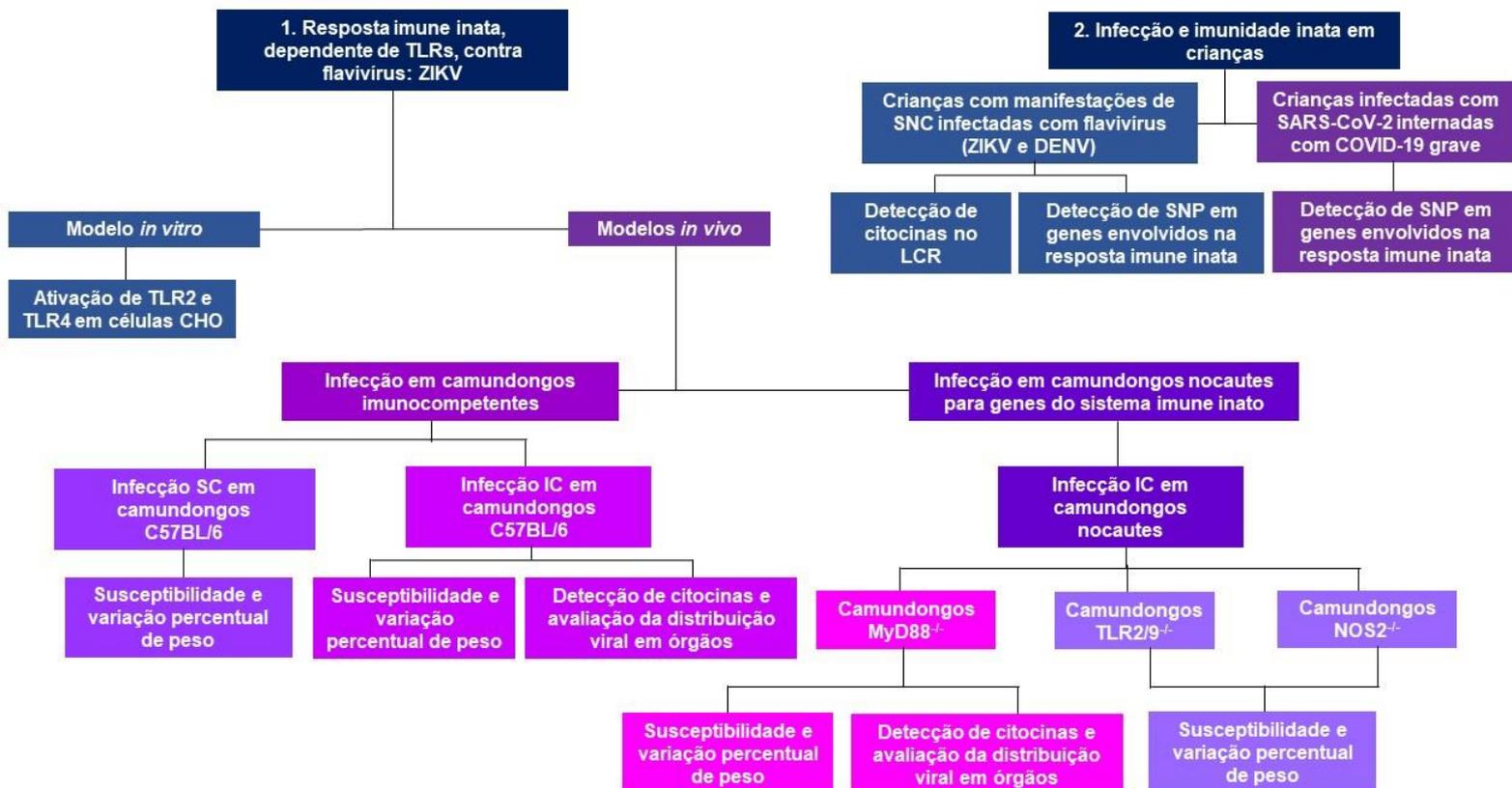


Figura 9: Fluxograma das estratégias de trabalho.

### 4.2. Cultivo celular

#### 4.2.1. 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 CRL-1660). Estas células foram cultivadas em meio Leibowitz (L-15) (Cultilab, Brasil), com adição dos antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) e do antifúngico anfotericina B (5 µg/mL) e 7% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), em estufa incubadora B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) a 28° C. Estas células foram utilizadas para a multiplicação viral e obtenção do estoque viral.

#### 4.2.2. Células Vero

Células Vero são células de linhagem contínua, derivadas de rim de macaco verde africano e foram adquiridas do ATCC (CCL-81). Estas foram cultivadas em meio Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich, USA), com adição dos antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) e do antifúngico anfotericina B (5 µg/mL) e 5% de SFB (Cultilab, Brasil), mantidas em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Estas células foram utilizadas na titulação viral.

#### 4.2.3. Células CHO

Todas as linhagens das células CHO (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 células foram utilizadas para o estudo da ativação de TLR4 após infecção com as diferentes amostras de ZIKV. Além desta linhagem de células citada acima, também foi utilizada uma linhagem não responsiva ao LPS, derivada do clone 3E1022, denominado 7.19, que é o controle negativo de células, as quais 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 as diferentes amostras de 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). A via de sinalização por TLR2 não precisa da proteína MD-2.

As células CHO foram uma generosa doação do Dr. Douglas T. Golenbock (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA). Estas células foram cultivadas em meio F12/Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA), suplementado com 5% de SFB (Gibco, USA), com adição de antibiótico ciprofloxacino (10 µg/mL) e higromicina B (0,25 mg/mL), para as células 7.19 e TLR 4 e, para as células TLR2, foram adicionados os antibióticos ciprofloxacino (10 µg/mL), higromicina

B (0,25 mg/mL) e geneticina (0,5 mg/mL). As células foram cultivadas em estufa, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **4.3. Vírus**

#### **4.3.1. Zika virus (ZIKV)**

Duas amostras asiáticas de ZIKV isoladas em 2015 de pacientes sintomáticos foram objeto do nosso estudo: ZIKV PE243, isolado de um paciente de Recife, Pernambuco (DUTRA *et al.*, 2016), cedidas por Marli Tenório Cordeiro (Instituto Aggeu Magalhães /FIOCRUZ-PE); 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). Estas duas amostras foram utilizadas para fazer uma comparação entre as respostas imunes ativadas por cada uma. A amostra africana MR766, gentilmente cedida pelo Dr. Mauricio Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto -FAMERP), também foi empregada nos testes como controle positivo. Esta amostra foi isolada de um macaco rhesus em 1947, em Uganda e foi multiplicada aproximadamente 150 vezes em cérebro de camundongos.

##### **4.3.1.1. Multiplicação**

Células C6/36 foram infectadas com ZIKV PE243, ZIKV SPH e ZIKV MR766, diluídos em meio L-15 (Cultilab, Brasil) 0% SFB (Cultilab, Brasil), utilizando-se uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,01. A adsorção das partículas virais à célula foi feita durante 1h em B.O.D. a 28°C, sendo realizada a homogeneização a cada 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio de cultura L-15 (Cultilab, Brasil) suplementado com 2% de SFB (Cultilab, Brasil), antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) e antifúngico anfotericina B (5 µg/mL). As células infectadas foram incubadas nas condições citadas por 7 dias, sendo observadas diariamente. Após 7 dias, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 3.000 r.p.m. por 5 min (centrífuga Sorvall RT-6000B, rotor H1000B) a 4°C. O sobrenadante clarificado foi coletado e distribuído em alíquotas de 0,2mL e estocadas a -70°C.

##### **4.3.1.2. Titulação**

Para determinar o título viral em unidades formadoras de placas (p.f.u.) dos estoques virais de ZIKV, foi utilizado o protocolo adaptado de Dulbecco e Vogt (1953).

Foram implantadas célula Vero na concentração de  $2 \times 10^5$  por poço da placa de 6 poços em meio MEM (Gibco, USA) suplementado com 5% de SFB (Cultilab, Brasil), antibióticos gentamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e penicilina (100 U/mL) e antifúngico anfotericina B (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Estas placas foram incubadas de um dia para o outro a 37° C em estufa com atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  do vírus diluído seriadamente foram inoculados em células com monocamada com cerca de 80% de confluência. Os vírus foram diluídos de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Como controle foi utilizado um poço com células não infectadas. Após homogeneização de 10 em 10 min durante 1h, foi adicionado meio MEM (Gibco, USA) contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC) (Synth, Brasil) e 2% de SFB (Cultilab, Brasil), as placas foram incubadas a 37°C por 6 dias em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . 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 multiplicado pelo inverso da diluição e pelo fator de diluição, dando o título final em unidades formadoras de placas por mL (u.f.p./mL).

#### **4.4. Ativação de TLR2 ou TLR4 em células CHO**

Para avaliar a ativação de TLR2 e TLR4, com consequente translocação nuclear de NF $\kappa$ B, disparada pelos vírus, as células CHO foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  por poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, foram infectadas pelos vírus com m.o.i. de 1 e 10 e incubadas a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$  durante 18h. Como controle, para as células transfectadas com TLR2 foi adicionado *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ( $10^3$  bactéria/poço), e, para as células transfectadas com TLR4, foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma-Aldrich, USA) (100 ng/poço), sendo que ambos também ficaram em contato com as células durante 18h em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  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. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x com 1 mM de azida de sódio, homogeneizadas em PBS e examinadas em citometria de fluxo no FACScan (BD Biosciences, USA), no IRR, com o auxílio do técnico responsável. As análises foram feitas utilizando o software FlowJo.

## 4.5. Modelo animal

Camundongos de 6 a 8 semanas das linhagens C57BL/6 e os nocautes para TLR2/9<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> e NOS2<sup>-/-</sup>, no background C57BL/6, foram fornecidos pelo biotério do Instituto René Rachou (IRR) e/ou Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/Fiocruz) e CEBIO/UFMG. Os camundongos foram mantidos em microisoladores e em estantes ventiladas no Biotério de Experimentação do IRR ou no Biotério do departamento de Microbiologia da UFMG, onde a temperatura (entre 22 e 24°C), umidade, ventilação, higienização e iluminação foram rigorosamente controladas. Alimentação e água foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram identificados através de marcações na cauda (utilizando caneta marcador permanente).

Todos os protocolos de experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da FIOCRUZ e da UFMG. A licença para o projeto “Estudo da resposta imune inata contra Zika virus em modelo murino” aprovada pela CEUA-FIOCRUZ teve duração até 28/11/2020 sob o número LW-33/16. A licença para o projeto “Produção de moléculas da resposta imune inata contra Zika vírus em modelo animal” aprovada pela CEUA-UFMG tem duração até 14/01/2023 sob número 381/2018.

Antes da eutanásia e da infecção, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg) conforme Manual de Normas Técnicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) 2004, por 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.

### 4.5.1. Vias de inoculação

#### 4.5.1.1. Infecção subcutânea (SC)

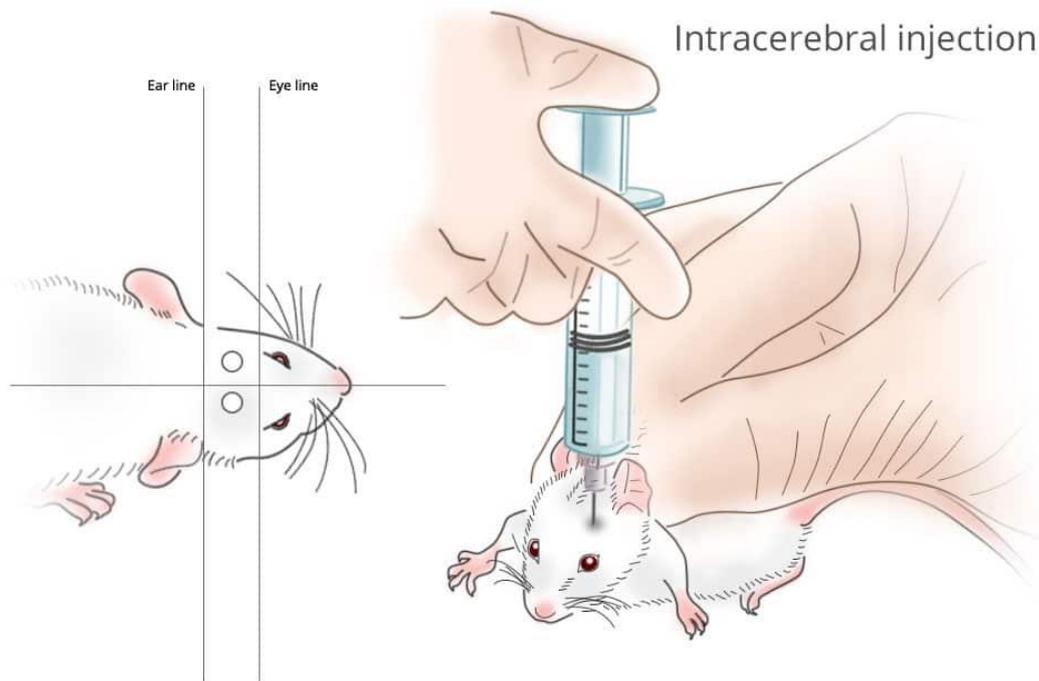
Os camundongos da linhagem C57BL/6 receberam o inóculo subcutâneo com 100 µL de ZIKV PE243, ZIKV SPH e ZIKV MR766. A infecção SC foi feita com o animal imobilizado utilizando agulha 8,0 x 0,3 mm e seringa BD Ultra-fine II de 50 UI ou 0,5mL.

A quantidade de vírus inoculada foi de  $5 \times 10^4$  p.f.u. por animal. Os animais controle (mock) receberam a mesma quantidade de inóculo contendo sobrenadante de células C6/36. Para o procedimento, o animal foi posicionado com a sua face ventral voltada para baixo. A injeção foi aplicada no dorso do animal. Os camundongos foram observados e pesados diariamente durante 3 semanas e a sobrevivência e pesos obtidos foram plotados no Prism (GraphPad) para determinar a curva de sobrevivência e porcentagem de perda de peso.

#### **4.5.1.2. Infecção intracraniana (IC)**

A infecção intracraniana (IC) dos camundongos utilizada foi a mesma previamente descrita em vários trabalhos do nosso grupo de pesquisa (AMARAL *et al.*, 2011; DE MIRANDA *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2018).

Resumidamente, após anestesiados, a inoculação viral via IC nos camundongos foi feita com agulha 8,0 x 0,3 mm e seringa BD Ultra-fine II de 50 UI ou 0,5 ml. O inóculo foi feito no quadrante esquerdo e posterior do cérebro do camundongo sendo a profundidade de penetração da agulha no cérebro do camundongo de 2 mm (Figura 10). Durante o período de anestesia dos camundongos, o plano anestésico foi monitorado pela avaliação dos reflexos motores e palpebrais dos camundongos. A inoculação foi feita em capela de fluxo laminar no biotério de experimentação do IRR ou do departamento de Microbiologia da UFMG.



**Figura 10:** Ilustração da inoculação intracraniana em camundongos. Adaptado: <http://www.clodosome.com/routes-of-administration/intracerebral-injection/>. Acesso em 07/12/2021.

Para determinar a dose ideal para infecção viral, camundongos C57BL/6 foram inoculados via IC com 10  $\mu$ l de suspensão viral contendo  $4 \times 10^2$  p.f.u.,  $4 \times 10^3$  p.f.u e  $2 \times 10^4$  p.f.u de ZIKV PE243 e ZIKV SPH. Os animais utilizados como controle positivo receberam 10  $\mu$ L de suspensão viral contendo  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV MR766. Os animais “mock infected” foram inoculados com 10  $\mu$ l do sobrenadante das células C6/36 não infectadas obtido no experimento de produção do estoque dos respectivos vírus. Os animais foram observados e pesados diariamente durante 3 semanas para determinar a curva de sobrevivência e perda de peso e para verificar a presença de sinais clínicos como perda de peso, prostração, eriçamento dos pelos, arqueamento do dorso, conjuntivite, tremores e paralisia. Os camundongos que apresentaram sinais acompanhados de perda de peso de 25% foram eutanasiados, de acordo com recomendação do comitê de ética.

Definida a dose ideal, animais C57BL/6 e nocautes para TLR2/9<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> e NOS2<sup>-/-</sup> foram inoculados via IC com 10  $\mu$ l da suspensão viral contendo  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243, ZIKV SPH ou ZIKV MR766. Os animais “mock infected” foram inoculados com 10  $\mu$ l do sobrenadante das células C6/36 não infectadas obtido no experimento de produção do estoque dos respectivos vírus. Para a determinação da

curva de sobrevivência e de porcentagem de perda de peso e verificar a presença de sinais clínicos, os camundongos foram observados e pesados diariamente durante 3 semanas. Os camundongos que apresentaram sinais acompanhados de perda de peso de 25% foram eutanasiados, de acordo com recomendação do comitê de ética.

Camundongos C57BL/6 e nocautes para Myd88<sup>-/-</sup> foram inoculados via IC com 10 µL de suspensão viral contendo 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV PE243, ZIKV SPH e ZIKV MR766 e foram eutanasiados após 3 dias da infecção. Estes animais também foram pesados diariamente. Imediatamente após a eutanásia, foi feita a coleta de sangue e a retirada de maneira asséptica do cérebro, fígado, baço, rins e testículos/ovários. Os órgãos foram pesados e acondicionados em microtubos, sendo imediatamente congelados a -70°C, para posterior utilização nos ensaios para detecção de RNA viral, quantificação de citocinas ou detecção de partículas virais.

#### **4.5.2. qPCR para detecção de RNA viral**

##### **4.5.2.1. Extração de RNA viral**

A extração do RNA viral foi feita utilizando o kit de extração QIAamp® Viral RNA (QIAGEN, USA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 140 µL dos sobrenadantes obtidos no item 5.2.1.1. foram adicionados a 560 µL do tampão AVL e incubado a temperatura ambiente por 10 min. Foram adicionados 560 µL de etanol absoluto e a solução foi homogeneizada. O volume total da amostra foi aplicado na coluna de sílica (em duas vezes de 630 µL), a qual foi centrifugada. Foram feitas duas lavagens com os tampões AW1 e AW2 para retirada de outros componentes celulares e possíveis resíduos. O RNA viral foi eluído com 60 µL de tampão AVE e armazenado a -70°C. O RNA viral foi utilizado como controle positivo nas reações de PCR em tempo real para detecção de RNA viral nos órgãos dos camundongos infectados.

##### **4.5.2.2. Extração de RNA total de tecidos**

Os órgãos cérebro, fígado, baço, rins e testículos dos animais C57BL/6 foram submetidos à extração de RNA.

A extração do RNA foi feita segundo o protocolo indicado pelo fabricante do reagente de TRIzol (Invitrogen, USA). Resumidamente, o tecido (aproximadamente 80mg) foi macerado em homogeneizador MiniBeadBetter-16 modelo 607 (BioSpec,

USA) durante 1 min. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 15 min. A separação das fases foi feita por centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R). A fase aquosa (superior, transparente), onde o RNA está presente, foi coletada e transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com a adição de isopropanol, seguida de centrifugação a 12000 x g por 10 min a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R). O sobrenadante foi descartado e o RNA dissolvido em água RNase/DNase free. O RNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) a 260nm e armazenado a -70°C.

#### 4.5.2.3. qPCR One-step para ZIKV

Para qPCR foram utilizados os iniciadores e sondas listados na tabela 1. Para cada reação, foram utilizados 1 µL do RNA obtido no item 4.3.2.2, 5 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, USA), 0,5 µL de cada iniciador (10µM), 0,2 µL da sonda (10µM), 0,2 µL da enzima GoScript RT (Promega, USA) e H<sub>2</sub>O ultrapura q.s.p. 10µL. As amostras foram amplificadas no *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA), seguindo as condições: 45° por 15 min para a transcrição reversa, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e pareamento e extensão a 60°C por 1 min.

**Tabela 1: Iniciadores e sonda utilizados para detecção de RNA viral.**

Alvo	Sequência	Gene Alvo	Fragmento	Referência
	F – CCGCTGCCCAACACAAG			
ZIKV	R – CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	ENV	76pb	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008.
	P – [fam]AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA			

#### **4.5.3. Determinação de título viral em órgãos de camundongos**

Para detectar a presença de partículas virais infecciosas, os tecidos de interesse foram retirados de maneira asséptica, pesados e imediatamente homogeneizados em solução de PBS 1X em homogeneizador MiniBeadBetter-16 modelo 607 (BioSpec, USA) durante 1 min. e centrifugados a 1000 x g por 15 min a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R). A titulação foi feita em células Vero, seguindo o protocolo descrito no item 5.2.1.2.

#### **4.5.4. Cytometric Beads Array (CBA)**

Ensaio citofluorométrico com microesferas fluorescentes (*Cytometric Beads Array* – CBA) (BD Biosciences, USA) foram feitos para dosar os níveis de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN $\gamma$ , TNF e IL12-70 no cérebro, fígado, baço, rins e testículos, dos camundongos C57BL/6 e nocautes para MyD88<sup>-/-</sup>. Nestes ensaios foi empregada uma mistura de microesferas recobertas com anticorpos específicos, com distintas intensidades de fluorescência, que combinada à citometria de fluxo permitem a detecção das citocinas de interesse.

Assim, para a realização destes ensaios, os tecidos foram retirados de maneira asséptica e imediatamente homogeneizados em homogeneizador MiniBeadBetter-16 modelo 607 (BioSpec, USA) em solução de PBS 1X contendo inibidores de protease (cOmplete, Mini, EDTA-free – Hoffmann–La Roche, Suíça) e centrifugados a 1000 x g por 15 min a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R) por duas vezes. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e analisados, de acordo com as orientações do fabricante do kit de CBA (Mouse Inflammation Kit - BD Biosciences, USA). A leitura das amostras foi feita no equipamento FACScan (BD Biosciences, USA) da plataforma de citometria do IRR.

#### **4.6. Amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano (LCR)**

As amostras de LCR foram provenientes do Hospital Infantil João Paulo II/FEHMIG (HIJPII), situado em Belo Horizonte – MG, em casos de manifestações de SNC em crianças de 0 a 15 anos, entre os anos de 2014 e 2019. As amostras foram acompanhadas de dados do prontuário dos pacientes, os dados citoquímicos do LCR e o diagnóstico da doença estabelecido pelo prontuário do hospital. As amostras

coletadas foram acondicionadas em nitrogênio líquido até serem transportadas para o Laboratório de Vírus na UFMG, onde permaneceram armazenadas à temperatura de -80°C até a realização de testes moleculares para detecção de vírus. A detecção do RNA viral foi feita por PCR em tempo real para as amostras de ZIKV e PCR para DENV foi realizada previamente em outros estudos no Laboratório de Vírus. Para este estudo, foram utilizadas amostras positivas para ZIKV e DENV. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética na Pesquisa do HIJPII (n° 66691617.2.3002.5119) e no Comitê de Ética do Instituto René Rachou (n° 66691617.2.3001.5091), com suporte financeiro das agências CAPES, CNPq, Instituto René Rachou, DECIT, PAPES VI/FIOCRUZ PrPq – UFMG e FNDCT N° 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika.

As amostras de sangue de crianças foram coletadas no HIJPII. As amostras foram acompanhadas dos prontuários dos pacientes. Todas as amostras utilizadas são de pacientes que foram infectados por SARS-CoV-2 confirmado por RT-PCR ou teste rápido e internados com complicações em UTI. O sangue foi coletado em tubo de coleta de sangue à vácuo com EDTA e armazenado em freezer -20°C até o seu processamento. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética na Pesquisa do Instituto René Rachou (n° 37207920.6.0000.5091).

#### **4.6.1. Detecção de citocinas em LCR de pacientes infectados com ZIKV e DENV**

Para detecção de citocinas no LCR dos pacientes, 50 µL de LCR foram centrifugados a 1000 x g durante 5 min a 4°C (centrifuga Eppendorf 5415R) para separação dos debris celulares. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das citocinas IFN $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2, a qual foi realizada seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do kit de CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences).

#### **4.7. Análise de SNP**

Para analisar a presença de SNPs em genes de TLRs e em proteínas da cascata ativada por TLRs associados às infecções virais foi feita uma busca no PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Os SNP selecionados foram: rs3775291 (SANTOS *et al.*, 2019) e rs5743316 (BIYANI *et al.*, 2015) no gene de *tlr3*;

rs179008 no gene de *tlr7* (MUKHERJEE *et al.*, 2019); rs8177374 no gene de *tirap* (ALAGARASU *et al.*, 2015); rs387907272 no gene de *myd88* (CHANG *et al.*, 2016); rs1024611 no gene de *mcp-1* (CHOWDHURY *et al.*, 2017) e; rs61942233 no gene de *oas3* (DUTTA *et al.*, 2017).

#### 4.7.1. Desenho dos iniciadores

As sequências dos genes foram obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) foi selecionada uma sequência de 150 a 500 pares de bases antes e após o local do SNP para desenho dos pares de iniciadores através da ferramenta Pick Primers (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Foram escolhidas temperaturas de pareamento entre 50°C e 57°C com tamanho do fragmento amplificado de até 500 pares de base. Os iniciadores escolhidos foram analisados quanto a formação de hairpin, heterodímeros e homodímeros utilizando a ferramenta OligoAnalyzer da IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados na análise de SNP.

Gene	SNP ID	Alteração	Consequência genética	Iniciadores	Fragmento (pb)
<i>tlr3</i>	rs3775291	C > T	Sem sentido	F - TCT TGG GAC TAA AGT GGA CA R - CCC AAC CAA GAG AAA GCA TC	470
	rs5743316	A > T	Sem sentido		
<i>tlr7</i>	rs179008	A > T	Sem sentido	F - AGA GAG GCA GCA AAT GGG AA R - TAG GAA ACC ATC TAG CCC CA	172
<i>tirap</i>	rs8177374	C > T	Sem sentido	F - GGT GCA AGT ACC AGA TGC T R - CAA CGC ATG ACA GCT TCT TT	181
<i>myd88</i>	rs387907272	T > C	Sem sentido	F - ATG GCT GTT GTT AAC CCT GG R - AGT CGC AGA CAG TGA TGA AC	180
<i>mcp-1</i>	rs1024611	A > G	Nenhuma	F - CTT TCC CTT GTG TGT CCC C R - ACA GTA AAC ACA GGG AAG GT	332
<i>oas3</i>	rs61942233	C > T	Códon de terminação	F - GCT GCT TCA GCC AGT TCA R - GTC AGT GAG AAG CTC AGC A	157

#### 4.7.2. Extração de DNA

O DNA genômico das amostras de LCR e sangue foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Foram adicionados 20 µl da Proteinase K (600 mAU/mL) fornecida pelo kit em 50 a 100 µL de LCR e 100 µL de sangue, para otimização da lise das amostras. Os volumes foram ajustados para 220 µL com PBS 1X. Foi adicionado 200 µL do tampão de lise AL, seguido de homogeneização e incubação a 56 °C por 60 min. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de etanol 100% (Merck) e centrifugado na coluna disponibilizada por 1 min a 6000 x g (centrífuga Eppendorf 5415R). Foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem AW1, seguido de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Em seguida, foi adicionado 500 µL do tampão de lavagem AW2, seguido

de centrifugação por 3 min a 12000 x *g* (centrífuga Eppendorf 5415R). O DNA das amostras de LCR foi eluído com 50 µL do tampão de eluição e o DNA das amostras de sangue foi eluído com 200 µL, foi feita incubação por 1 min à temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 1 minuto a 6000 x *g* (centrífuga Eppendorf 5415R). O DNA obtido foi armazenado em freezer -20°C.

#### **4.7.3. PCR para amplificação dos genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *myd88*, *mcp-1* e *oas3***

A amplificação do DNA dos fragmentos de genes de *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *myd88*, *mcp-1* e *oas3* foi feita pela PCR utilizando-se como molde o DNA extraído de amostras de LCR e de sangue.

Na reação foram adicionados 9,5 µL de DNA extraídos de LCR, 0,25 µL de cada iniciador a 10 mM e 10 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, USA) para um volume final de 20 µL. Entretanto, na reação utilizando o DNA extraído de amostras de sangue, foram utilizados 4 µL de DNA, 0,125 µL de cada iniciador a 10 mM; 10 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, USA) e água para um volume final de 20 µL.

As amplificações foram feitas em termociclador (Eppendorf), seguindo as seguintes variações de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, pareamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s. Seguido de extensão final de 72°C por 1 min. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 2.

Para a análise dos fragmentos de DNA amplificados, 5 µL da reação foram fracionados por eletroforese em gel agarose a 2 %, a 100 V, em tampão TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM). O gel foi corado durante 30 min com corante de DNA SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz azul (Thermo Scientific).

#### **4.7.4. Purificação do DNA amplificado por PCR**

Quando a visualização em gel de agarose mostrou banda única, a purificação foi feita diretamente do produto de PCR, utilizando os kits Gel Band Purification (GE Healthcare, USA) ou QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemanha). Quando duas

ou mais bandas foram visualizadas no gel, a banda de interesse foi cortada do gel e purificada utilizando os kits Gel Band Purification (GE Healthcare, USA) ou QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha). As purificações foram feitas de acordo com cada fabricante.

Para o kit Gel Band Purification (GE Healthcare, USA), para cada 15  $\mu\text{L}$  do produto de PCR ou 100 g de agarose, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do tampão de captura 3 e foi feita a transferência para a coluna fornecida pelo kit. Foi feita centrifugação por 30 s a 16000 x g (centrífuga Eppendorf 5415R). A coluna foi lavada com 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem 1, seguido de centrifugação nas mesmas condições. Em seguida, foi feita a eluição em 30  $\mu\text{L}$  do tampão de eluição 6, foi feita a incubação em temperatura ambiente durante 1 min seguido de centrifugação por 1 min a 16000 x g (centrífuga Eppendorf 5415R).

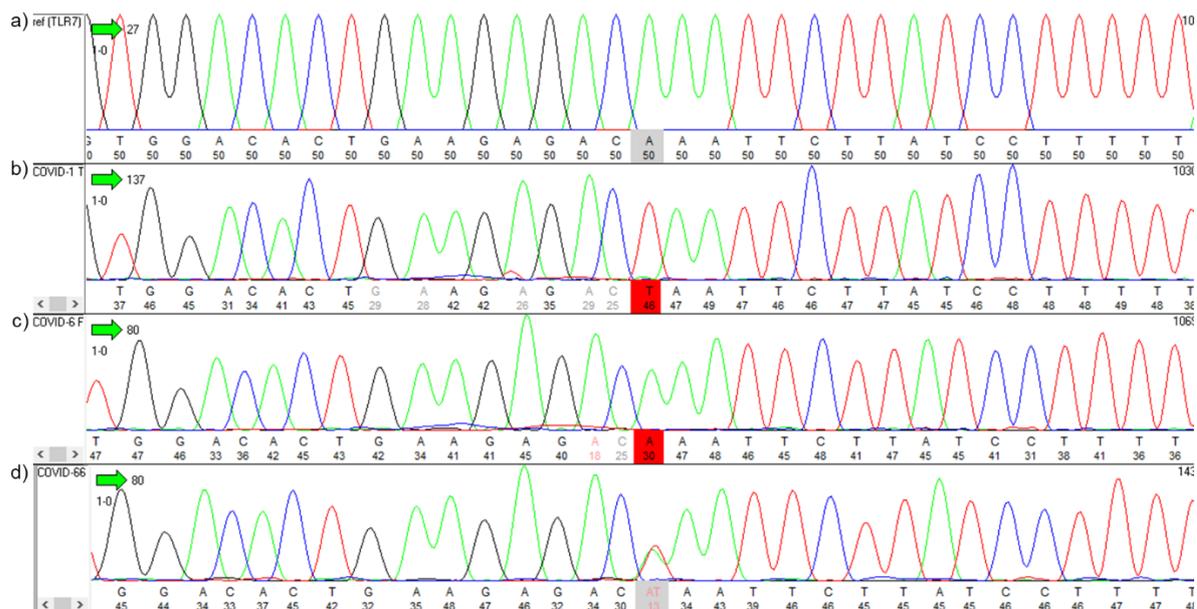
Para o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Alemanha), foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  do tampão para cada 15  $\mu\text{L}$  de reação e foi feita a transferência para a coluna fornecida pelo kit que foi centrifugada por 1 min a 16000 x g (centrífuga Eppendorf 5415R). A coluna foi lavada com 700  $\mu\text{L}$  do tampão PE, seguido de centrifugação nas mesmas condições. O conteúdo foi descartado e o tubo coletor foi reaproveitado em uma nova centrifugação nas mesmas condições. O DNA foi eluído em 50  $\mu\text{L}$  de tampão EB, incubado durante 1 min e centrifugado nas mesmas condições.

Para o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Alemanha), foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do tampão QG em 100 g de gel de agarose, foi feita incubação a 50°C por 10 min. Após completa dissolução do gel, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Merck, Alemanha), foi homogeneizado e o conteúdo foi transferido para uma coluna fornecida pelo kit. Foi feita centrifugação por 1 min a 16000 x g (centrífuga Eppendorf 5415R) e o conteúdo foi descartado. Para retirar qualquer excesso de gel, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  do tampão QG e foi feita nova centrifugação nas mesmas condições. A coluna foi lavada com 700  $\mu\text{L}$  do tampão PE, seguido de centrifugação nas mesmas condições. O conteúdo foi descartado e o tubo coletor foi reaproveitado em nova centrifugação a 7900 x g por 1 min (centrífuga Eppendorf 5415R). O DNA foi eluído em 50  $\mu\text{L}$  de tampão PE, incubado durante 5 min e centrifugado por 1 min a 16000 x g (centrífuga Eppendorf 5415R). Todos os DNAs purificados obtidos foram quantificados em

espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) e armazenados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.7.5. Sequenciamento Sanger e análise das sequências

Os DNAs amplificados por PCR e purificados foram sequenciados pelo método de sequenciamento Sanger pela equipe da plataforma de sequenciamento de DNA do IRR utilizando o sequenciador de DNA - ABI 3730 da Thermo Fisher. Cada amostra foi sequenciada em duplicada com os iniciadores forward e reverse. As sequências obtidas para cada gene de interesse foram alinhadas com as sequências de referência obtidas no GenBank, utilizando-se o software MEGA-X, determinando assim a posição da base de interesse (SNP) na sequência obtida. Após determinar a posição do SNP, foi feita a análise nos softwares Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) e novoSNP (Department of Molecular Genetics - VIB and University of Antwerp), quando a base visualizada correspondia com a base da sequência referência (Figura 11A), a amostra foi denominada homocigoto normal (Figura 11C). Quando a base visualizada correspondia a base mutada, a amostra foi denominada homocigoto mutado (Figura 11B), e quando foram visualizadas as duas bases mutadas, a amostra foi denominada heterocigoto (Figura 11D).



**Figura 11: Análise do SNP rs179008 no gene *tlr7* em DNA de crianças infectadas com SARS-CoV-2 no programa novoSNP. A) Sequência referência obtida no GenBank; B) Amostra homocigoto mutada; C) Amostra homocigoto normal; D) Amostra heterocigoto.**

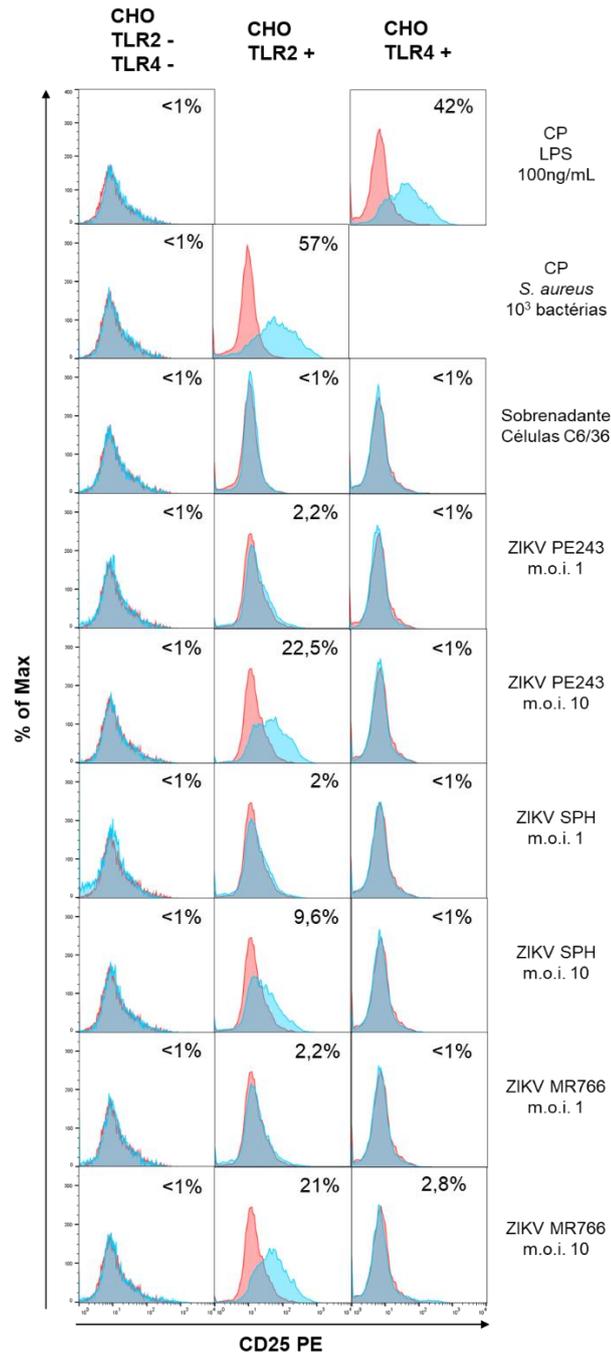
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Resposta imune inata, dependente de TLRs, contra flavivírus: ZIKV

#### 5.1.1. Ativação de TLR2 e TLR4 *in vitro* em células CHO por ZIKV

Para avaliar a ativação dos TLRs por ZIKV foi empregado um modelo de células CHO transfectadas estavelmente com os TLR2 e TLR4 que foram expostas às amostras de ZIKV PE243, SPH, isoladas no Brasil, e à amostra africana MR766.

A ativação de TLR2 foi observada nas células CHO exposta aos ZIKV PE243, SPH e MR766 somente com a m.o.i. 10 (Figura 12). A ativação de TLR2 foi diferente entre as amostras de ZIKV pois ZIKV SPH induziu ativação inferior a 10% e PE243 e MR766, induziram ativação superior a 20% (Figura 12). Não foi observada ativação de TLR4 após a exposição das células com ZIKV PE243, SPH ou MR766 nas m.o.i. empregadas (Figura 12).



**Figura 12: Ativação de TLR2 por ZIKV.** Células CHO transfetadas estavelmente com TLR2 (TLR2+), TLR4 (TLR4+) ou com nenhum deles (TLR2- / TLR4-) foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço em placa de 24 poços. As células foram estimuladas com ZIKV PE243, SPH e MR766 com m.o.i. = 1 e m.o.i. = 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 células C6/36 (mock), no qual os vírus foram multiplicados. 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 FACSCalibur (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.

Os nossos resultados indicaram diferenças biológicas na resposta entre as duas amostras brasileiras e corroboraram estudos de Chen e colaboradores (2015)

com outro flavivírus, o DENV. Estes autores também demonstraram que TLR2 foi ativado pela proteína NS1 de DENV em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) infectadas (CHEN; NG; CHU, 2015). Porém, Azeredo e colaboradores (2010) demonstraram que além de TLR2, TLR4 também foi expresso na superfície de monócitos isolados de pacientes com dengue na fase aguda da doença. Modhiran e colaboradores (2015) também obtiveram resultados que demonstraram que a proteína NS1 de DENV ativa TLR4 em PBMC humano e em macrófagos murinos. Nossos resultados não demonstraram a ativação de TLR4, o que pode ter ocorrido pois a célula utilizada é epitelial e não uma célula do sistema imune, que foi o caso dos estudos citados.

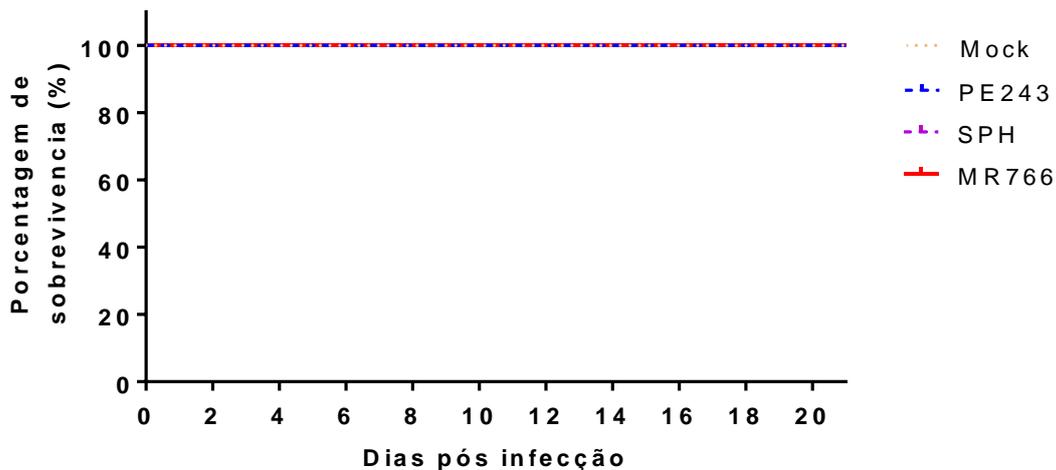
### **5.1.2. Modelos *in vivo* para estudo da resposta imune contra ZIKV**

Os modelos animais mais utilizados para estudo de ZIKV são animais nocautes, principalmente animais deficientes na via de sinalização de IFN, visto que camundongos adultos e imunocompetentes são resistentes à infecção. Estes modelos podem não refletir a doença humana e não são ideais para uma boa compreensão da patogênese e da resposta imune contra o vírus (PARDY *et al.*, 2017).

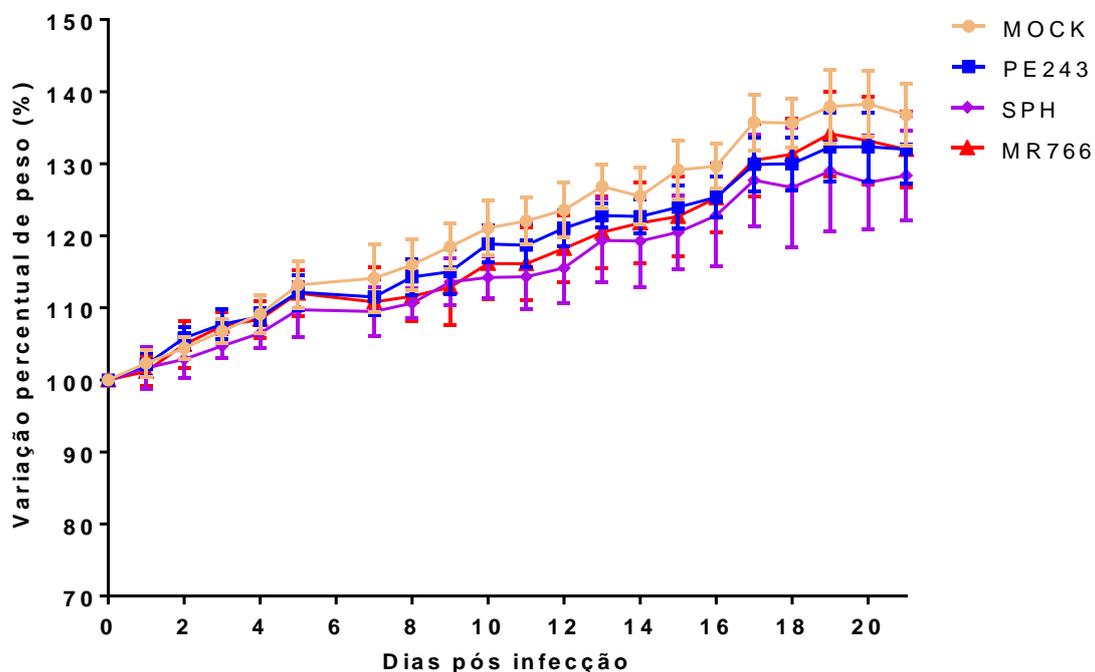
O objetivo do nosso trabalho foi estudar e comparar a resposta imune inata após a infecção com diferentes de ZIKV, as amostras brasileiras PE243 e SPH, da linhagem asiática, portanto em nosso estudo foram utilizados camundongos imunocompetentes. Duas vias de inoculação em camundongos imunocompetentes C57BL/6, a subcutânea (SC) e via intracraniana (IC), foram testadas. A infecção pela via SC é a que mais se assemelha à infecção natural por ZIKV, já a infecção via IC é um modelo comumente utilizado e padronizado pelo nosso grupo em infecções com DENV (FERREIRA *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2011; DE MIRANDA *et al.*, 2012; de SOUZA *et al.*, 2013; CAMPOS, 2016; SANTOS *et al.*, 2018). Como controle positivo, foi utilizado o ZIKV MR766, da linhagem africana, que é uma amostra adaptada ao camundongo (DICK, 1952b).

#### **5.1.2.1. Modelo de infecção por via SC em camundongos imunocompetentes infectados com ZIKV**

Camundongos C57BL/6 foram infectados via SC com  $1 \times 10^5$  p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766, observados e pesados diariamente.



**FIGURA 13: Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção subcutânea com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino foram infectados pela via subcutânea com  $1 \times 10^5$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6), ZIKV SPH (n = 6) e ZIKV MR766 (n = 5). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. Como controle (n = 6) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock).



**FIGURA 14: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção subcutânea com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino foram infectados pela via subcutânea com  $1 \times 10^5$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6), ZIKV SPH (n = 6) e ZIKV MR766 (n = 5). Como controle (n = 6) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

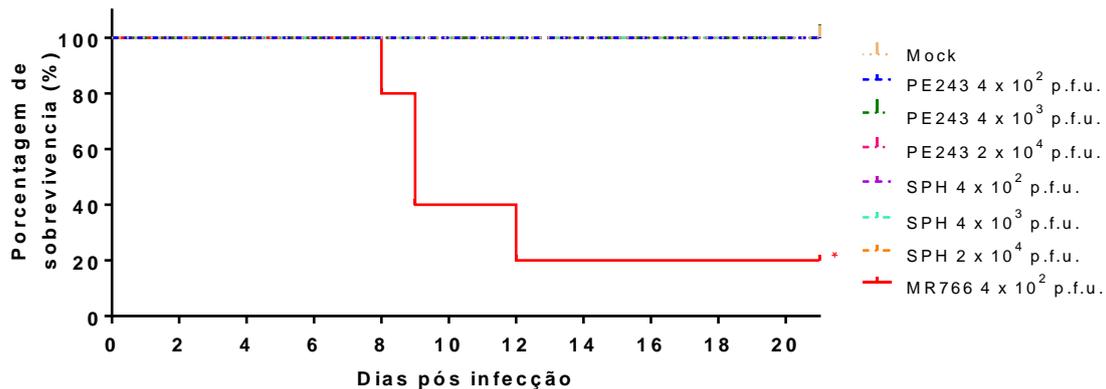
Os camundongos C57BL/6 infectados via SC com  $1 \times 10^5$  p.f.u. não apresentaram sinais clínicos ou mortalidade (Figura 13), tendo comportamento semelhante aos camundongos não infectados (mock). Nenhum grupo de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 ou SPH, nem mesmo o controle positivo (MR766), apresentou perda de peso (Figura 14). Foi feito teste não-paramétrico de Mann-Whitney e não foi observada diferença estatística na variação percentual de pesos entre os grupos (Figura 14). Estes resultados corroboram estudos publicados, os quais demonstraram que camundongos C57BL/6 adultos infectados via SC com amostras de ZIKV, mesmo o ZIKV MR766, não apresentaram sinais clínicos, perda de peso ou óbito (Lazear *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2016; Saiz, 2016; Shin *et al.*, 2021). Porém, foi possível observar que a partir do 5º d.p.i. há uma tendência de redução de ganho de peso corporal nos camundongos infectados com ZIKV PE243, SPH e MR766 em relação aos camundongos mock (Figura 14). Este experimento foi realizado uma vez e por corroborar a literatura, este modelo não foi empregado em nossos estudos posteriores.

#### **5.1.2.2. Modelo e infecção por via IC em camundongos imunocompetentes com ZIKV**

Como os camundongos infectados via SC não apresentaram sinais, nem mesmo os infectados com o controle positivo ZIKV MR766, foram feitos experimentos empregando a inoculação IC. Este modelo de infecção tem sido utilizado para inoculação de DENV em vários trabalhos do nosso grupo (FERREIRA *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2011; DE MIRANDA *et al.*, 2012; de SOUZA *et al.*, 2013; CAMPOS, 2016; SANTOS *et al.*, 2018). Nestes trabalhos, foi avaliado o potencial de neurovirulência de uma amostra de DENV não adaptada em camundongos imunocompetentes. Assim sendo, esta via de inoculação foi empregada para avaliar possíveis diferenças de neurovirulência das amostras ZIKV PE243 e SPH em camundongos imunocompetentes.

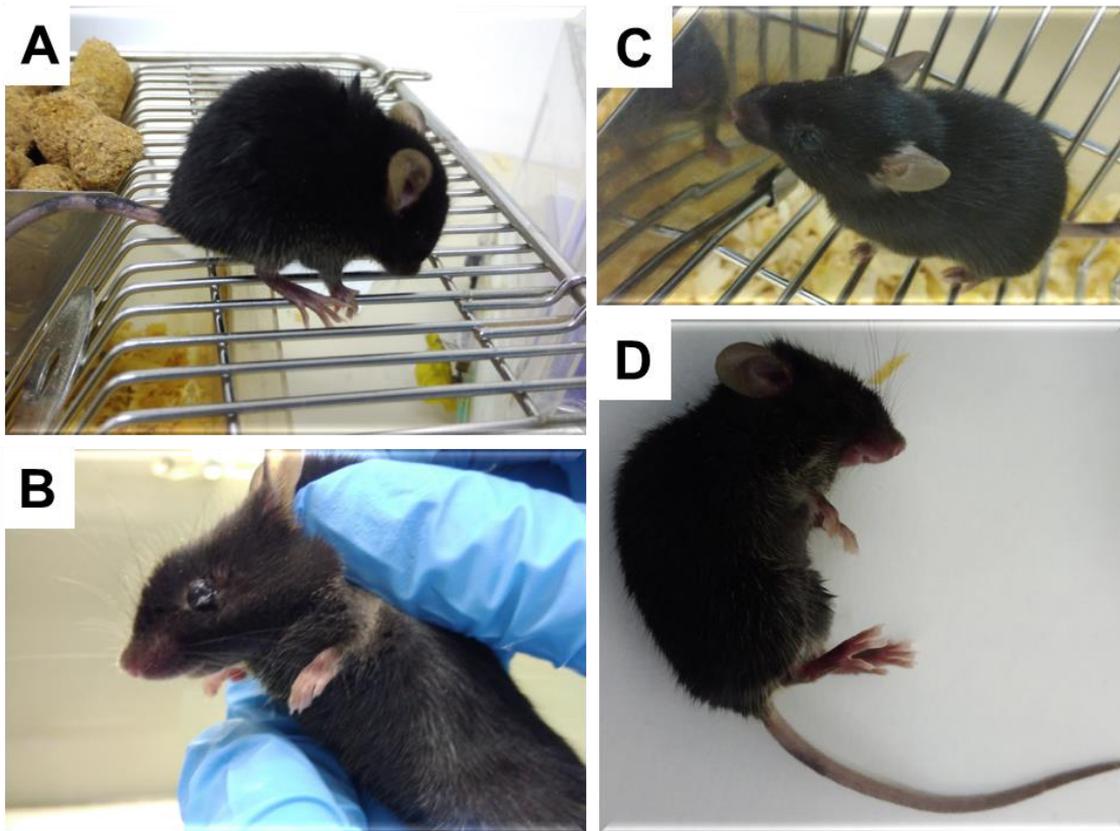
### 5.1.2.2.1. Susceptibilidade e variação percentual de peso em camundongos imunocompetentes infectados via IC

Camundongos C57BL/6 foram inoculados via IC com diferentes doses de ZIKV PE243 e SPH. Após a infecção, os camundongos foram monitorados e pesados diariamente durante 21 dias.



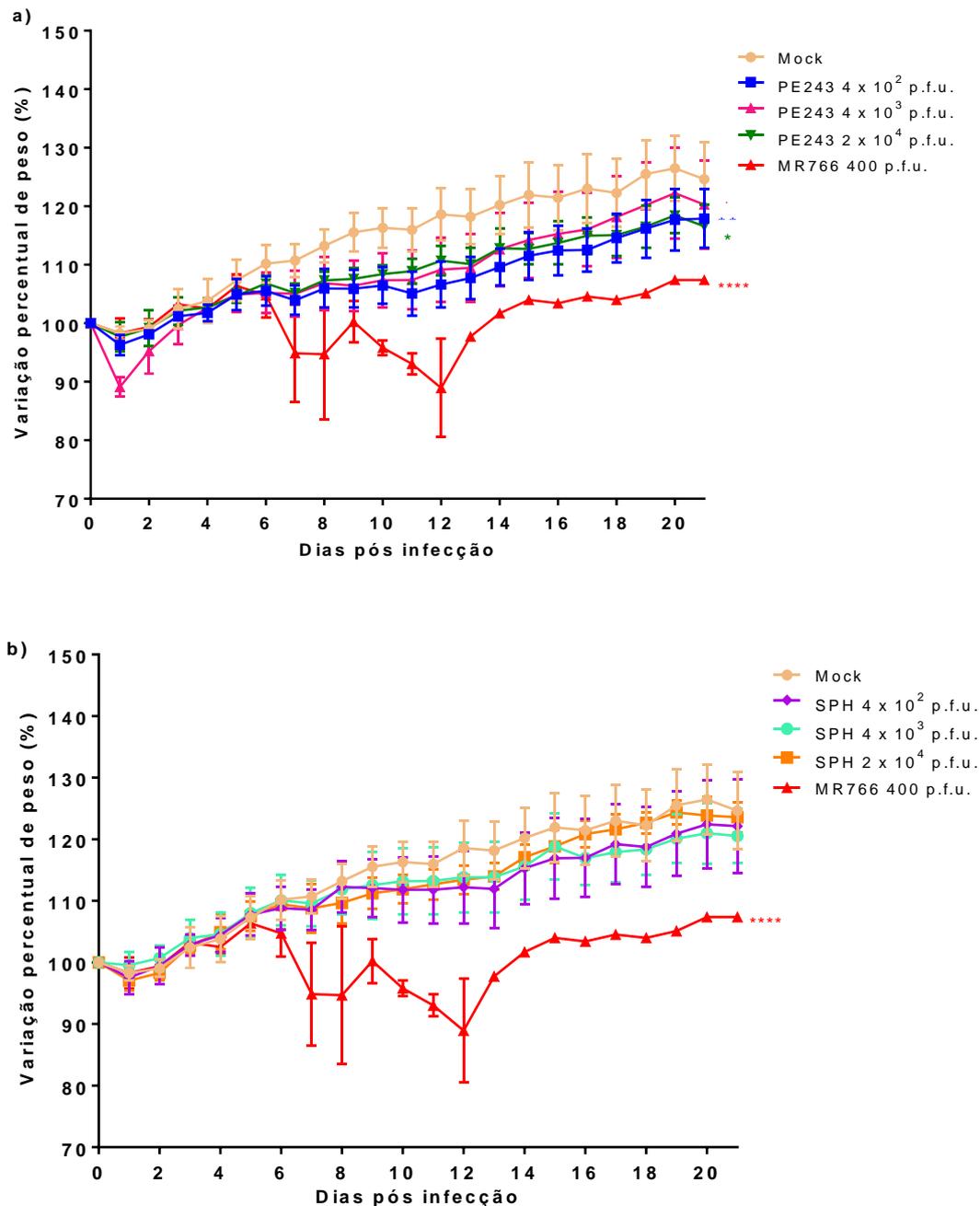
**Figura 15: Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino (n = 5) foram infectados pela via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u.,  $4 \times 10^3$  p.f.u ou  $2 \times 10^4$  p.f.u. de ZIKV PE243 e SPH, ou com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV MR766. Como controle (n = 5) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A análise estatística foi feita com o teste Logrank. \*p < 0,05 quando comparados com grupo controle (mock).

Conforme mostrado na figura 14, os camundongos C57BL/6 infectados com PE243 e SPH não apresentaram mortalidade ou sinais clínicos nas doses  $4 \times 10^2$  p.f.u.,  $4 \times 10^3$  p.f.u e  $2 \times 10^4$  p.f.u testadas. Os camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV MR766 apresentaram mortalidade de 80% (Figura 15), o que está de acordo com dados descritos na literatura (DICK, 1952b; HAYASHIDA *et al.*, 2019). Os camundongos inoculados com MR766 apresentaram sinais clínicos como encurvamento do dorso, eriçamento do pelo, conjuntivite e paralisia (Figura 16) a partir do 6º d.p.i e morreram entre o 8º e o 12º d.p.i. (Figura 15). Um camundongo infectado com ZIKV MR766 apresentou perda de peso de mais de 25% e foi eutanasiado no 9º d.p.i.



**Figura 16: Sinais clínicos apresentados por camundongos C57BL/6 infectados via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV MR766.** Camundongos C57BL/6 selvagens infectados por via IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV MR766 foram pesados e observados diariamente para avaliação dos sinais clínicos e mortalidade. **A)** Eriçamento dos pelos e encurvamento do dorso; **B)** Conjuntivite dia XX e **C)** Conjuntivite dia XXX; **D)** Paralisia.

Os camundongos C57BL/6 foram pesados diariamente e, para melhor visualização, os gráficos da variação percentual de peso estão demonstrados separados na figura 17. A figura 17a apresenta os resultados dos camundongos C57BL/6 infectados com as diluições de ZIKV PE243 e  $4 \times 10^2$  p.f.u. ZIKV MR766. A figura 17b apresenta os resultados dos camundongos C57BL/6 infectados com as diluições de ZIKV SPH e  $4 \times 10^2$  p.f.u. ZIKV MR766.



**Figura 17: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino ( $n = 5$ ) foram infectados pela via intracraniana com ZIKV PE243, SPH e MR766. Como controle ( $n = 5$ ) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A variação percentual de peso em camundongos infectados via IC foi avaliada. **a)**  $4 \times 10^2$  p.f.u.,  $4 \times 10^3$  p.f.u. e  $2 \times 10^4$  p.f.u. de ZIKV PE243 **b)**  $4 \times 10^2$  p.f.u.,  $4 \times 10^3$  p.f.u. e  $2 \times 10^4$  p.f.u. de ZIKV SPH. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparados com grupo controle (mock).

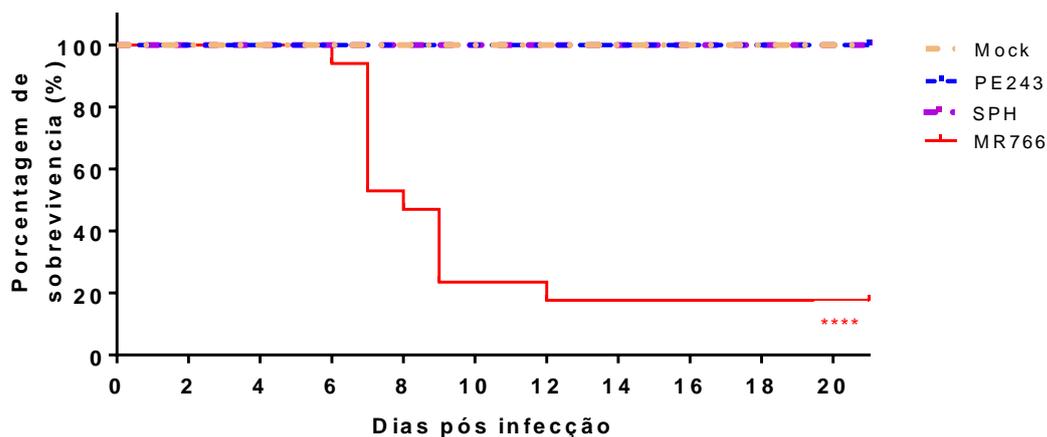
Nos camundongos infectados com ZIKV PE243, a partir do 6<sup>o</sup> d.p.i., independente da concentração de vírus empregada, houve um ganho de peso significativamente menor quando comparados aos camundongos mock (Figura 17a).

Esta diferença foi de aproximadamente 5% no 6º e 7º d.p.i. e aumentou para aproximadamente 10% do 8º ao 21º d.p.i. A análise estatística com teste não-paramétrico de Mann-Whitney mostrou diferença estatística entre todos os grupos infectados comparados ao mock, com  $p < 0,05$  para os grupos infectados com  $4 \times 10^3$  p.f.u e  $2 \times 10^4$  p.f.u e de  $p < 0,01$  para o grupo infectado com  $4 \times 10^2$  p.f.u de ZIKV PE243.

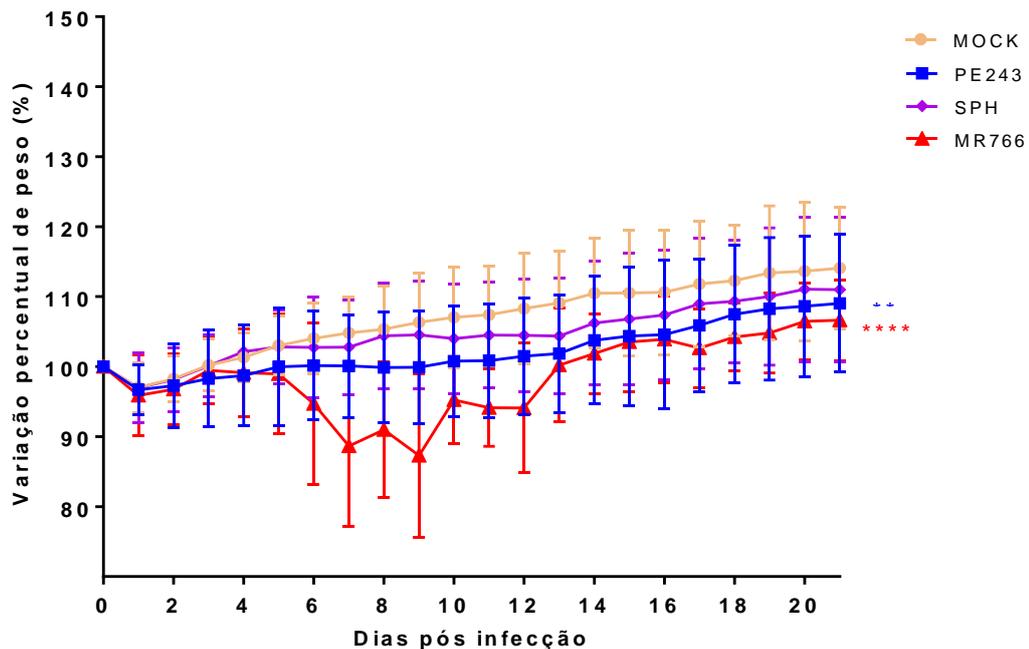
Diferentemente dos camundongos infectados com ZIKV PE243, não houve variação significativa nos pesos dos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV SPH em nenhuma das condições de concentração de vírus empregadas (Figura 17b).

Como não foi observada diferença nas variações de peso corporal entre os camundongos infectados com ZIKV SPH nas diferentes concentrações de vírus (Figura 17b) e nos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 a significância estatística foi maior com a inoculação de  $4 \times 10^2$  p.f.u (Figura 17a), esta concentração foi empregada nos outros dois experimentos sucessivos que foram feitos independentemente.

As figuras 18 e 19 representam, respectivamente, a curva de sobrevivência e a variação percentual de peso em camundongos infectados com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766 em três experimentos realizados independentemente.



**Figura 18: Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u de ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino foram infectados pela via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 ( $n = 16$ ), SPH ( $n = 14$ ) e ZIKV MR766 ( $n = 17$ ). Como controle ( $n = 16$ ) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A análise estatística foi feita com o teste Logrank. \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparados com grupo controle (mock).



**Figura 19: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u de ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino foram infectados pela via intracraniana com ZIKV PE243 ( $n = 16$ ), SPH ( $n = 14$ ) e MR766 ( $n = 17$ ). Como controle ( $n = 16$ ) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A variação percentual de peso em camundongos infectados via IC foi avaliada. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparados com grupo controle (mock).

Os camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV MR766 ganharam peso até o 3º d.p.i., mantiveram o peso do 3º ao 5º d.p.i. e começaram a perder peso do 5º para o 6º d.p.i., com uma diferença de aproximadamente 5% em relação aos camundongos mock, com perda acentuada do 5º ao 7º d.p.i., chegando a uma diferença de aproximadamente 15% em comparação com os camundongos mock no 7º d.p.i. (Figura 19).

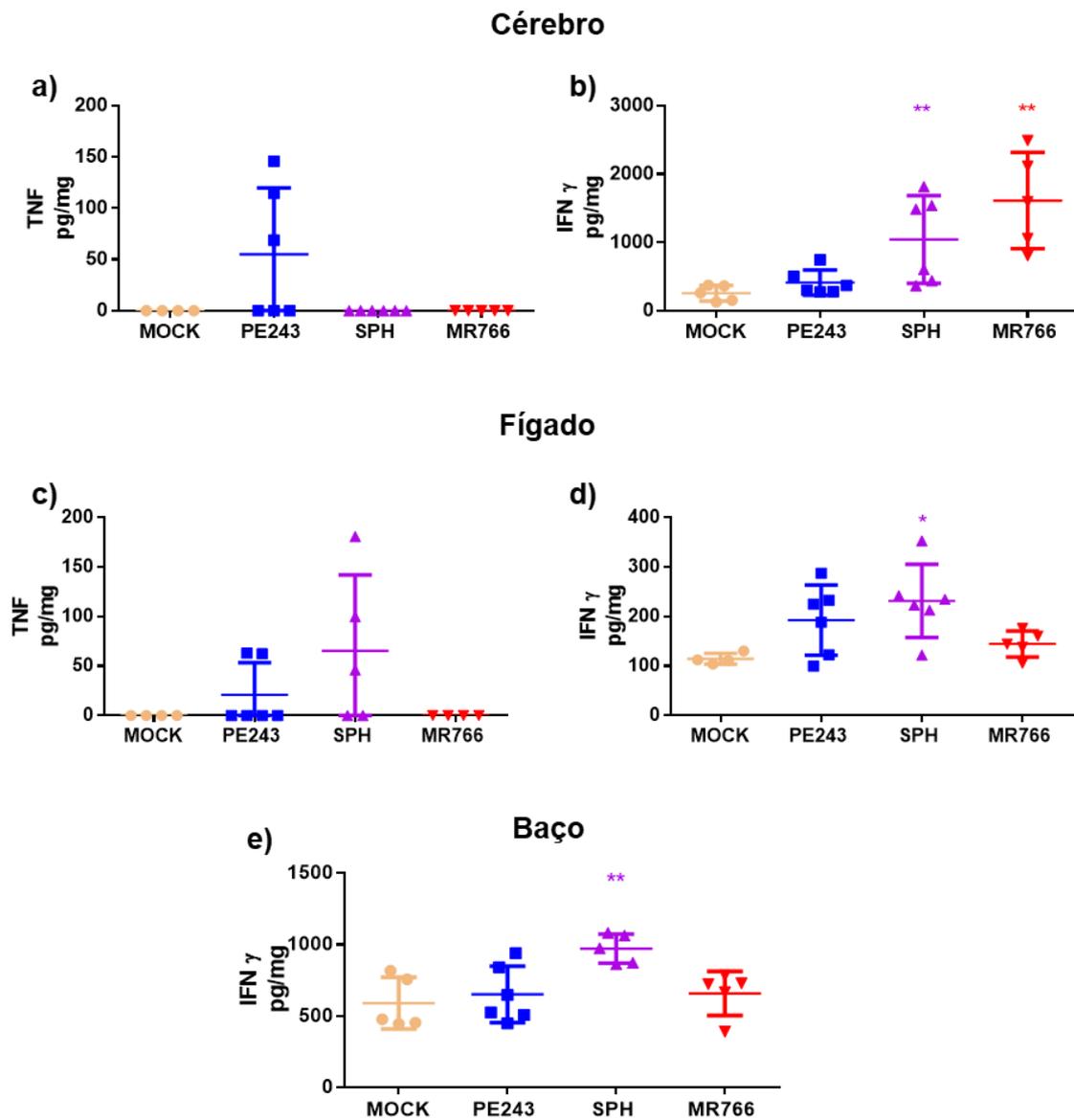
Os sinais clínicos começaram no 5º e 6º d.p.i. com conjuntivite e leve arqueamento do dorso. A evolução dos sinais clínicos foi rápida, com o primeiro óbito ocorrendo no 6º d.p.i. A partir do 7º d.p.i., a maioria dos camundongos começou a apresentar conjuntivite mais grave, arqueamento do dorso mais iminente, eriçamento dos pelos e paralisia, com a maioria dos óbitos ocorrendo do 7º ao 9º d.p.i., terminando com uma taxa de 80% de mortalidade até o 12º d.p.i. (Figura 18). Três camundongos sobreviveram, eles perderam peso, mas se recuperaram (Figuras 18 e 19).

Nos camundongos C57BL/6 infectados com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 houve um ganho de peso significativamente menor quando comparados com os

camundongos mock, o que não ocorreu com os camundongos infectados com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV SPH, que tiveram ganho de peso não significativamente diferente em relação aos camundongos mock, apesar de haver uma tendência de redução de ganho de peso corporal (Figura 19). Este resultado demonstra que há diferença no perfil de infecção nos camundongos por estas duas amostras brasileiras. Carbaugh e colaboradores (2020), demonstraram diferença na letalidade e perda de peso em camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> infectados por via SC pela pata (footpad) com duas amostras de ZIKV, H/PF/2013 e PRVABC59, que compartilham 99% de identidade de nucleotídeos e possuem apenas 3 diferenças de aminoácidos. ZIKV H/PF/2013 foi letal nos camundongos IFNAR<sup>-/-</sup>, com a perda de peso iniciando no 6º dpi e com todos os camundongos morrendo no 11º dpi. Ao contrário, a infecção com ZIKV PRVABC59 não causou perda de peso ou mortalidade (Carbaugh *et al.*, 2020). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados via IC com diferentes amostras de outro flavivírus, DENV, apresentaram diferença na mortalidade e perda de peso, com os camundongos infectados com 400 p.f.u. das amostras DENV-3 MG-20 e MG-21 apresentando sinais clínicos, mortalidade e perda de peso, enquanto camundongos infectados com 400 p.f.u. da amostra DENV-3 Pi76 não apresentaram sinais, mortalidade ou perda de peso (Souza, 2012). Outro estudo do nosso grupo demonstrou que a infecção por via IC com a amostra DENV-3 MG-20 é letal em camundongos C57BL/6, com os animais apresentando sinais neurológicos e meningoencefalite difusa, com edema nas meninges, infiltração meníngea de células inflamatórias mononucleares associada a intensa vasculite e degeneração do parênquima cerebral, enquanto os animais infectados com a amostra DENV-3 Pi64 sobreviveram e apresentaram meningite branda com edema focal de meninges e presença discreta de células mononucleares (Ferreira *et al.*, 2010).

#### **5.1.2.2.2. Quantificação de citocinas em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados via IC com ZIKV.**

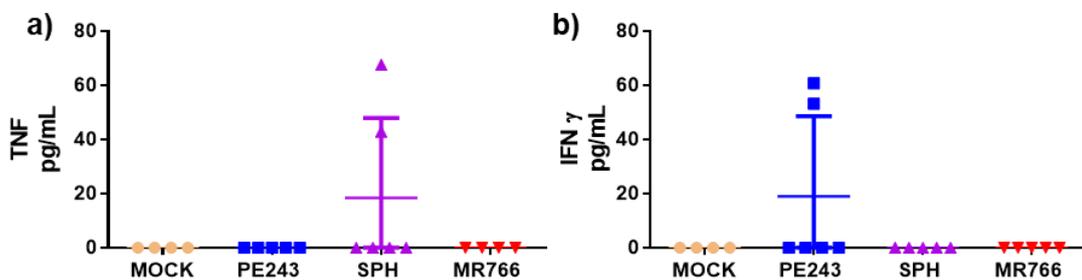
As citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70 foram avaliadas no cérebro, fígado, baço, rim, testículo e soro de camundongos C57BL/6 infectados via IC com ZIKV PE243, SPH e MR766 e eutanasiados no 3º d.p.i. A eutanásia foi feita no 3º d.p.i. pois a resposta imune inata se inicia horas após a infecção e persiste até o 4º dia, quando se inicia a resposta imune adquirida (MURPHY; TRAVERS, 2010).



**Figura 20: Quantificação de citocinas no 3° d.p.i. em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados via IC com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados via IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6), SPH (n = 6) e MR766 (n = 5) e foram eutanasiados com 3 dias após a infecção. Os órgãos foram retirados para a quantificação citocinas por CBA. Camundongos controle (mock) foram inoculados com sobrenadante de célula C6/36. Foi utilizado o *Kit mouse inflammation* (BD Bioscience, USA), que detecta IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite detecção não foram representadas na figura. **a)** Detecção de TNF no cérebro **b)** IFN- $\gamma$  no cérebro **c)** TNF no fígado **d)** IFN- $\gamma$  no fígado **e)** IFN- $\gamma$  no baço. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*p < 0,05 e \*\*p < 0,01 quando comparados com o grupo controle (mock).

Um aumento de TNF foi detectado no cérebro de três camundongos (Figura 20a) e no fígado de dois camundongos (Figura 20c) infectados com ZIKV PE243 e no fígado de três camundongos infectados com ZIKV SPH (Figura 20c) foi observado. Camundongos inoculados com ZIKV SPH apresentaram um aumento significativo de

IFN- $\gamma$  no cérebro (Figura 20b), fígado (Figura 20d) e baço (figura 20e), quando comparados aos camundongos *mock infected*. Também houve aumento significativo de IFN- $\gamma$  no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV MR766 quando comparados aos camundongos *mock infected* (Figura 19b). Não houve detecção de nenhuma das citocinas analisadas no rim e no testículo dos camundongos C57BL/6 infectados. Não houve detecção das citocinas IL-6, IL-10, MCP-1 e IL-12p70 nos órgãos avaliados.



**Figura 21: Quantificação de citocinas no soro de camundongos C57BL/6 infectados via IC com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados via IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 ( $n = 6$ ), SPH ( $n = 6$ ) e MR766 ( $n = 5$ ) e foram eutanasiados com 3 dias após a infecção. O soro foi analisado por CBA para quantificar as citocinas. Camundongos controle (*mock*) foram inoculados com sobrenadante de célula C6/36. Foi utilizado o *Kit mouse inflammation* (BD Bioscience, USA), que detecta IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite de detecção não foram representadas na figura. **a)** Detecção de TNF **b)** IFN- $\gamma$ . A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

TNF foi detectado no soro de dois camundongos infectados com ZIKV SPH e não houve detecção desta citocina no soro dos camundongos infectados com ZIKV PE243 (Figura 21a). No soro, o IFN- $\gamma$  foi detectado em dois camundongos infectados com ZIKV PE243 e não houve detecção desta citocina no soro de camundongos infectados com ZIKV SPH (Figura 21b).

Estes resultados indicam haver respostas biológicas diferentes à infecção com as amostras de ZIKV, corroborando os resultados de avaliação de redução percentual de peso dos animais (Figura 19), com maior concentração de TNF e menor concentração de IFN- $\gamma$  no cérebro de camundongos infectados com ZIKV PE243 (Figura 20a e b) e aumento significativo de IFN- $\gamma$  nos órgãos dos camundongos infectados com ZIKV SPH. O estudo de Ferreira e colaboradores (2010) também demonstrou diferença na detecção de citocinas no cérebro e soro de camundongos C57BL/6 infectados via IC com diferentes amostras de DENV-3. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-6 e MCP-1 em homogenatos cerebrais e soros foram maiores em camundongos

infectados com DENV-3 MG-20 em relação aos camundongos infectados com DENV-3 Pi64 (Ferreira *et al.*, 2010).

Para confirmar a eficiência de infecção dos camundongos e verificar a distribuição de ZIKV nos diferentes órgãos, foi feita titulação do cérebro e fígado e qPCR One-step para detecção do RNA viral no cérebro, fígado, baço, rim e testículos dos camundongos infectados via IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6), SPH (n = 6) e MR766 (n = 5) eutanasiados no 3º d.p.i. As amostras foram tituladas seguindo o protocolo descrito no item 5.4.3 e não foram observadas placas de lise. Para a qPCR, foi seguido o protocolo descrito no item 5.4.2.3, as amostras foram feitas em duplicata e foram consideradas positivas quando houve amplificação nas duas replicatas, negativas quando não houve amplificação e indeterminadas quando houve amplificação em uma replicata, sendo que o resultado está apresentado na tabela 3.

**Tabela 3:** Detecção de RNA viral em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.

Órgão	Cérebro			Fígado			Baço			Rim			Testículo		
	D	ND	IND	D	ND	IND	D	ND	IND	D	ND	IND	D	ND	IND
<b>Vírus ZIKV</b>															
<b>PE243</b>	6	0	0	4	2	0	6	0	0	5	1	0	3	2	1
<b>SPH</b>	6	0	0	5	1	0	6	0	0	3	2	1	4	1	1
<b>MR766</b>	5	0	0	1	3	1	3	0	2	4	0	1	4	0	1

Para a detecção do RNA viral após inoculação IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6), SPH (n = 6) e MR766 (n = 5), os camundongos C57BL/6 foram eutanasiados para remoção do cérebro, fígado, baço, rim e testículos no 3º dia após a infecção. Foi feita a extração do RNA total utilizando o reagente de TRIzol (Invitrogen, USA), seguido de qPCR One-step para ZIKV. As amostras foram feitas em duplicata e foram consideradas positivas quando houve amplificação nas duas replicatas (D – Detectado), negativas quando não houve amplificação (ND – Não detectado) e indeterminadas (IND) quando houve amplificação em uma replicata,

Nos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 foi detectado RNA viral no cérebro e no baço de todos os camundongos, no fígado de 4, no rim de 5, no testículo de 3 e uma amostra de testículo foi indeterminada. Nos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV SPH foi detectado RNA viral no cérebro e no baço de todos os camundongos, no fígado de 5, no rim de 3, no testículo de 4 e uma amostra de rim e uma de testículo foram indeterminadas. Nos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV MR766, foi detectado RNA viral no cérebro de todos os camundongos, no fígado de 1, no baço de 3, no rim de 4 e no testículo de 4 e uma amostra de fígado, duas de baço, uma de rim e uma de testículo foram

indeterminadas. Este resultado demonstra que apesar da inoculação ser IC e dos camundongos não apresentarem sinais, a infecção foi eficiente e o vírus não ficou restrito ao cérebro, sendo capaz de se disseminar pelo organismo atingindo outros órgãos. De Souza (2012) também detectou disseminação de DENV-3 após infecção IC em camundongos C57BL/6, o RNA viral foi detectado no fígado, baço, pulmão e linfonodos.

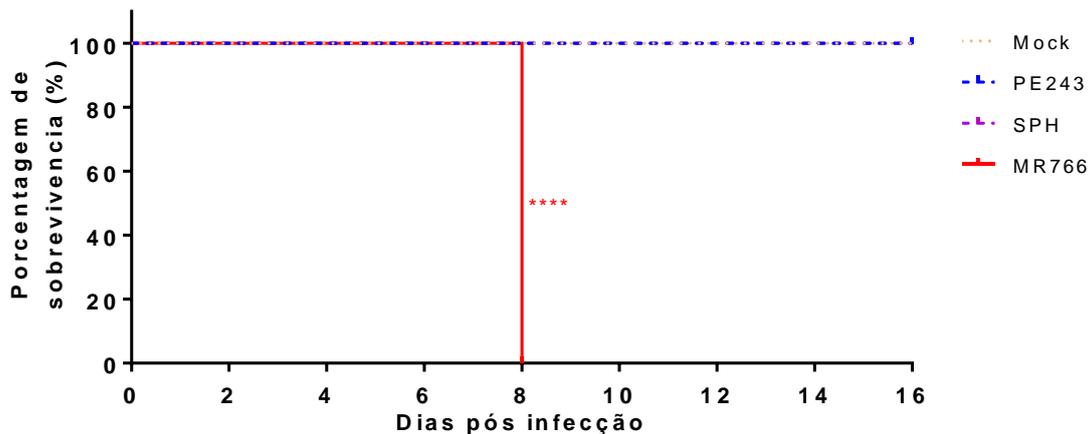
Os resultados em qPCR identificaram com sensibilidade a distribuição sistêmica de RNA genômico de ZIKV nos camundongos, porém os protocolos de titulação de vírus não tiveram sensibilidade suficiente para detectar as partículas infecciosas. HAYASHIDA e colaboradores (2019) também não encontraram o vírus disseminado utilizando a hibridização *in situ*, possivelmente devido a uma menor sensibilidade do teste também.

### **5.1.2.3. Modelo de infecção em camundongos nocautes para genes do sistema imune inato infectados com ZIKV**

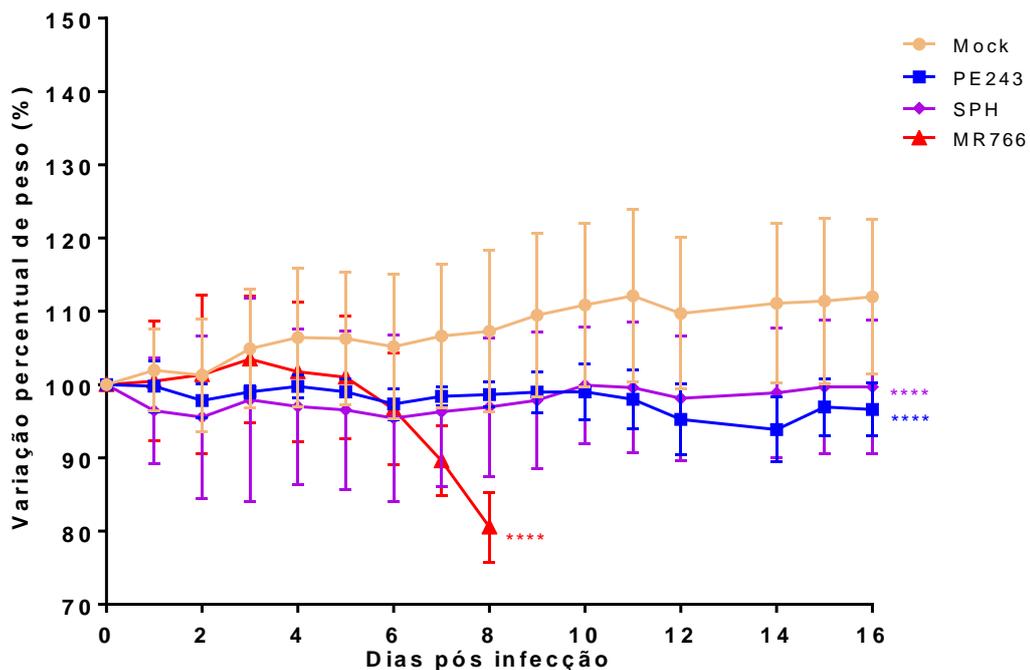
#### **5.1.2.3.1. Infecção por ZIKV em camundongos MyD88<sup>-/-</sup>**

##### **5.1.2.3.1.1. Susceptibilidade e variação percentual de peso e citocinas em camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados via IC**

Para avaliar o papel da proteína adaptadora MyD88 na infecção por ZIKV, camundongos MyD88<sup>-/-</sup> foram infectados com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766, monitorados e pesados diariamente durante 16 dias.



**Figura 22: Curva de sobrevivência em camundongos MyD88<sup>-/-</sup> de 6 a 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos MyD88<sup>-/-</sup> do sexo masculino (n = 6) foram infectados pela via intracraniana com 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766. Como controle (n = 6) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 16 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A análise estatística foi feita com o teste Logrank. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparados com grupo controle (mock).



**Figura 23: Variação percentual de peso em camundongos MyD88<sup>-/-</sup> de 6 a 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 do sexo masculino (n = 6) foram infectados pela via intracraniana com 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766. Como controle (n = 6) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 16 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A variação percentual de peso em camundongos infectados via IC foi avaliada. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparados com grupo controle (mock).

Apenas os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV MR766 apresentaram sinais clínicos como conjuntivite, eriçamento dos pelos, encurvamento do dorso e

paralisia. No 8º d.p.i. todos os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com MR766 foram eutanasiados por apresentarem paralisia avançada (Figura 22). Os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com MR766 começaram a apresentar sinais clínicos no 5º d.p.i. e começaram a perder peso do 5º para o 6º d.p.i. (Figura 23), no 8º d.p.i. a perda de peso foi de aproximadamente 20% em relação ao dia 0 e aproximadamente 25% em relação ao grupo mock (Figura 23). Diferente dos camundongos C57BL/6, 100% dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> apresentaram paralisia grave e foram eutanasiados no 8º d.p.i. (Figura 22), enquanto os sinais apresentados pelos camundongos C57BL/6 foram de evolução mais lenta, alguns sobrevivendo até o 12º d.p.i. e três camundongos C57BL/6 se recuperaram da infecção (Figura 18).

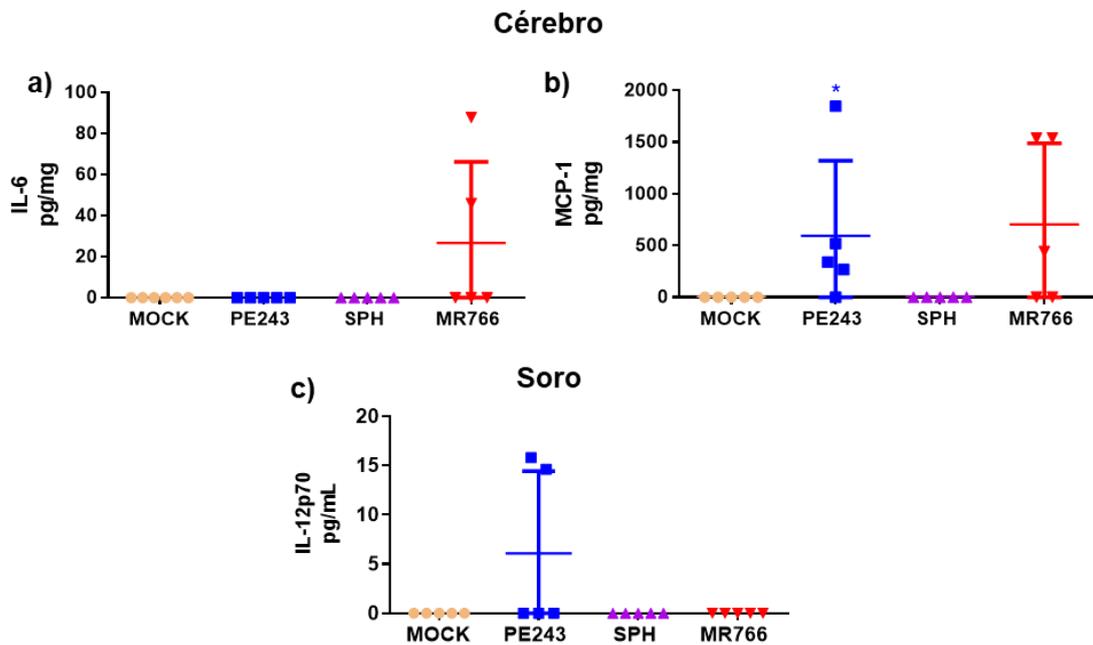
Assim como os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243, os camundongos infectados com ZIKV SPH não apresentaram sinais clínicos (Figura 22). Porém, os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH não conseguiram ganhar peso, nem mesmo recuperar o peso que tinham no dia 0 antes da infecção (Figura 23), diferente dos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 e SPH que ganharam peso (Figura 19). Após a infecção, os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 apresentaram variação de peso corporal significativamente diferente quando comparados aos camundongos mock, esta diferença entre as médias foi de 5% no 3º d.p.i. e aumentou ao longo dos dias, chegando a 15% a menos de peso quando comparados com os camundongos mock no 16º d.p.i. (Figura 23). Esta diferença foi significativamente maior que a diferença apresentada nos camundongos C57BL/6, com  $p < 0,0001$  quando comparados aos camundongos mock (Figura 23), enquanto os camundongos C57BL/6 apresentaram  $p < 0,01$  quando comparados aos camundongos mock (Figura 19). Os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV SPH apresentaram diferença significativa na variação de peso corporal quando comparados ao grupo mock (Figura 23), com  $p < 0,0001$ , diferente dos camundongos C57BL/6 que não apresentaram diferença significativa e sim um constante leve menor ganho de peso quando comparado aos camundongos mock (Figura 19).

Os TLRs são um dos principais receptores que contribuem para a detecção eficaz de flavivírus (SERMAN; GACK, 2019). MyD88 é uma proteína adaptadora envolvida na via de sinalização de todos os TLRs, com exceção do TLR3 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Seu recrutamento induz a resposta imune inata

através da produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010; SAIKH, 2021). Diferente dos camundongos imunocompetentes, os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH não conseguiram ganhar peso, demonstrando que a ausência da proteína adaptadora MyD88<sup>-/-</sup>, embora não tenha sido fundamental para a resposta do hospedeiro, pois os camundongos sobreviveram, pode ter prejudicado a resposta imune como um todo, dificultando a resposta imune inata e o ganho de peso dos camundongos. Isto demonstra, portanto, que a resposta do camundongo não depende exclusivamente de MyD88.

#### **5.1.2.3.1.2. Quantificação de citocinas em órgãos de camundongos MyD88 infectados via IC com ZIKV**

Para avaliar as citocinas, camundongos MyD88<sup>-/-</sup> foram infectados via IC e eutanasiados no 3º d.p.i. As citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ ., TNF e IL-12p70 foram quantificadas por CBA em tecidos do cérebro, baço, testículo e soro.



**Figura 24: Quantificação de citocinas no cérebro e soro de camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> de 6 a 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> (n = 6) foram inoculados via IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766 e foram eutanasiados com 3 dias após a infecção. O cérebro e o soro foram analisados por CBA para quantificar citocinas. Camundongos controle (mock) foram inoculados com sobrenadante de célula C6/36 (n = 6). Foi utilizado o *Kit mouse inflammation* (BD Bioscience, USA), que detecta IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite de detecção não foram representadas na figura. **a)** Detecção de IL-6 no cérebro **b)** MCP-1 no cérebro **c)** IL-12p70 no soro. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*p < 0,05 quando comparados com grupo controle (mock).

IL-6 foi detectado no cérebro de 2 de 6 camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> e de MCP-1 no cérebro de 3 de 6 camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV MR766 (Figura 24). Estas citocinas não foram detectadas nos cérebros de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV MR766, nos quais houve aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$  (Figura 20).

Nos camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> infectados com SPH, não houve detecção de nenhuma citocina nos órgãos e nos soros analisados (Figura 24), diferente dos camundongos C57BL/6, em quem houve aumento significativo de IFN- $\gamma$  no cérebro, fígado e baço e detecção de TNF no fígado e soro (Figura 20).

Nos camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> infectados com PE243 foi detectado aumento significativo de MCP-1 no cérebro (Figura 24), diferente dos camundongos C57BL/6, onde foi detectado TNF no cérebro de 3 camundongos (Figura 20). Foi detectado IL-12p70 no soro de 2 camundongos *MyD88*<sup>-/-</sup> infectados com PE243 (Figura 24),

diferente dos camundongos C57BL/6 onde foi detectado IFN- $\gamma$  no soro de 2 camundongos (Figura 20).

Não houve detecção de nenhuma das citocinas no baço e testículo dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados. Não foi possível realizar a análise das citocinas do fígado e rim, mesmo clarificando as amostras, o citômetro de fluxo detectou acúmulo de debris e não realizou a leitura.

HAYASHIDA e colaboradores (2019) determinaram a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias no SNC, fígado e testículos de camundongos C57BL/6, IFNAR<sup>-/-</sup> e Rag1<sup>-/-</sup>. Nos camundongos C57BL/6 foram detectados níveis aumentados de mRNA de IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$ , TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  no 4<sup>o</sup> d.p.i. no cérebro, de mRNA de TNF no dia 6<sup>o</sup> d.p.i. no fígado e não foram observadas diferenças no testículo. O mRNA para IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5 não foi detectável em nenhum órgão d.p.i. nos camundongos C57BL/6. Nos camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> foi detectado aumento nos níveis de mRNA de IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$ , TNF, IL1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no 4<sup>o</sup> d.p.i no SNC, nos níveis de mRNA de IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$ , TNF e IL-1 $\beta$  no fígado e de mRNA de IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$ , TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 nos testículos (HAYASHIDA *et al.*, 2019). E ainda, HAYASHIDA e colaboradores (2019) também detectaram diferença nas respostas entre os camundongos C57BL/6 e IFNAR<sup>-/-</sup>, com níveis de mRNA de IFN- $\beta$ , TNF e IL-1 $\alpha$  significativamente mais baixos no SNC de camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> em relação aos camundongos C57BL/6, enquanto no fígado, o mRNA de TNF e IL-1 $\beta$  e, no testículo, o mRNA de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 foram significativamente maiores. Similar aos camundongos C57BL/6, nos camundongos Rag1<sup>-/-</sup>, foi detectado aumento nos níveis de mRNA de IFN $\alpha$ 1, IFN- $\beta$ , TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  no SNC enquanto não foram detectados mRNA de IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5. Já os níveis de mRNA de TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  foram significativamente mais baixos no SNC de camundongos Rag1<sup>-/-</sup> em comparação com camundongos C57BL/6. Nenhum dos genes de citocina investigados mostrou níveis de mRNA significativamente aumentados no fígado e testículos nos camundongos Rag1<sup>-/-</sup>.

Assim como não foi detectado mRNA de citocinas nos testículos dos camundongos Rag1<sup>-/-</sup> analisados por HAYASHIDA e colaboradores (2019), não foram detectadas citocinas nos testículos dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup>, mas a técnica

utilizada foi diferente de HAYASHIDA e colaboradores (2019), foi utilizado CBA, que detecta a proteína e não o mRNA.

Também foi feita qPCR One-step para detecção do RNA viral no cérebro, fígado, baço, rim e testículos dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados e eutanasiados no 3º d.p.i. O resultado está demonstrado na tabela 4.

**Tabela 4:** Detecção de RNA viral em órgãos de camundongos *myd88<sup>-/-</sup>* infectados com ZIKV.

Órgão	Cérebro			Fígado			Baço			Rim			Testículo		
	D	ND	IND	D	ND	IND	D	ND	IND	D	ND	IND	D	ND	IND
<b>Vírus ZIKV</b>															
<b>PE243</b>	5	0	0	0	5	0	4	1	0	2	3	0	1	3	1
<b>SPH</b>	5	0	0	0	4	1	3	2	0	1	4	0	0	2	3
<b>MR766</b>	5	0	0	1	4	0	3	2	0	1	4	0	1	3	1

Para a detecção do RNA viral após inoculação IC com 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 5), SPH (n = 6) e MR766 (n = 5), os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> foram eutanasiados para remoção do cérebro, fígado, baço, rim e testículos no 3º dia após a infecção. Foi feita a extração do RNA total utilizando o reagente de TRIzol (Invitrogen, USA), seguido de qPCR One-step para ZIKV. As amostras foram feitas em duplicata e foram consideradas positivas quando houve amplificação nas duas replicatas (D – Detectado), negativas quando não houve amplificação (ND – Não detectado) e indeterminadas (IND) quando houve amplificação em uma replicata,

Nos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 (n = 5), foi detectado RNA viral no cérebro de todos os camundongos, no baço de 4, no rim de 2 e no testículo de 1 e uma amostra de testículo foi indeterminada. Não foi detectado RNA no fígado dos camundongos infectados com ZIKV PE243. Nos camundongos infectados com ZIKV SPH (n = 5) foi detectado RNA viral no cérebro de todos, no baço de 3, no rim de 1 camundongo e 3 amostras de testículo foram indeterminadas. Não foi detectado RNA viral no fígado dos camundongos infectados com ZIKV SPH. Também foi detectado RNA viral no cérebro de todos os camundongos infectados com ZIKV MR766 (n = 5) e no fígado de 1, no baço de 3, no rim de 1, no testículo de 1 e uma amostra de testículo foi indeterminada.

De maneira geral, com exceção do cérebro, a taxa de positividade de RNA viral nos órgãos dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados foi menor quando comparados aos camundongos C57BL/6. Todos os cérebros de camundongos MyD88<sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados com ZIKV PE243, SPH e MR766 foram positivos (Tabelas 4 e 3, respectivamente). O mesmo não ocorreu no baço, enquanto todos os baços dos

camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 e SPH foram positivos (Tabela 3), nos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> só 4 e 3 foram positivos (Tabela 4), respectivamente. Tanto os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> como os C57BL/6 infectados com MR766 foram positivos em 3 baços, porém, 2 baços dos camundongos C57BL/6 foram indeterminados (Tabela 3) e 2 baços dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> foram negativos (Tabela 4). Não foi detectado RNA viral em nenhum fígado dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com PE243 e SPH (Tabela 4), já nos camundongos C57BL/6, 4 e 5 fígados foram positivos (Tabela 3), respectivamente. Tanto nos camundongos C57BL/6 quanto nos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com MR766, 1 fígado foi positivo, com 1 indeterminado nos camundongos C57BL/6 (Tabela 3) e 4 negativos nos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> (Tabela 4). Enquanto os camundongos C57BL/6 infectados com PE243, SPH e MR766 apresentaram 5, 3 e 4 rins positivos, respectivamente (Tabela 3), os camundongos MyD88<sup>-/-</sup> apresentaram 2, 1 e 1 positivos (Tabela 4), respectivamente. No testículo, nenhum camundongo MyD88<sup>-/-</sup> infectado com SPH foi positivo, 3 foram indeterminados (Tabela 4), e nos camundongos C57BL/6, 4 foram positivos (Tabela 3). Enquanto camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com PE243 e MR766 apresentaram 1 testículo positivo (Tabela 4), camundongos C57BL/6 apresentaram 3 e 4 (Tabela 3), respectivamente.

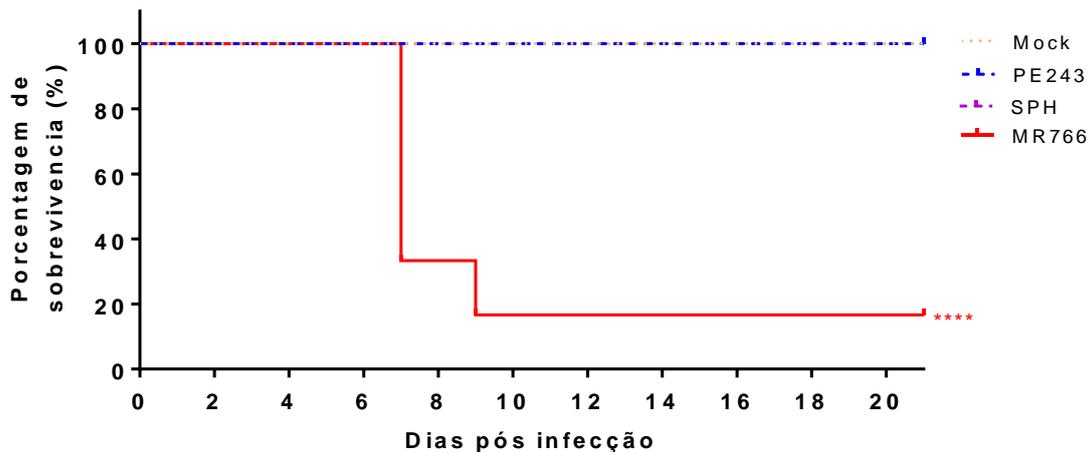
ENLOW e colaboradores (2021) também detectaram RNA viral no cérebro de camundongos nocautes no 3<sup>o</sup> d.p.i., no caso, foram utilizados camundongos TRIF<sup>-/-</sup>xIPS-1<sup>-/-</sup> de 6 semanas de idade, que foram infectados por via intravenosa com 1x10<sup>5</sup> p.f.u. do ZIKV PRVABC59. Diferente dos camundongos TRIF<sup>-/-</sup>xIPS-1<sup>-/-</sup>, nos camundongos C57BL/6 não houve detecção de RNA viral no cérebro. Os camundongos TRIF<sup>-/-</sup>xIPS-1<sup>-/-</sup> não apresentaram sinais clínicos da doença, não houve diferença no ganho de peso corporal entre os camundongos infectados e não infectados e todos sobreviveram após a infecção. Diferente dos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH utilizados neste trabalho, que apresentaram ganho de peso significativamente diferente em relação aos camundongos mock. E ainda, no cérebro dos camundongos TRIF<sup>-/-</sup>xIPS-1<sup>-/-</sup> infectados, foi detectado aumentos nos níveis de IL-1α, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IFNγ, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 e CXCL1 (ENLOW *et al.*, 2021).

LIMA e colaboradores (2022) detectaram RNA de ZIKV em soro, cérebro, testículos, epidídimo e próstata de camundongos AG129 machos de sete semanas de

idade injetados pela via footpad com  $1 \times 10^5$  p.f.u./mL com uma amostra brasileira de ZIKV. SHENG e colaboradores (2021) detectaram RNA de ZIKV no epidídimo e nos testículos de camundongos AG6 (deficientes de receptor de IFN- $\alpha/\beta$  e IFN- $\gamma$ ) no 5º e 8º d.p.i. infectados com  $1 \times 10^5$  p.f.u. do ZIKV pela via footpad. SHENG e colaboradores (2021) também detectaram níveis de IL-6 e IL-28 consideravelmente aumentados no epidídimo em relação aos testículos e, no 8º d.p.i., os níveis de 18 citocinas testadas não foram significativamente alterados no testículo.

#### **5.1.2.3.2. Infecção por ZIKV em camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup>**

Sabe-se que TLR3 (reconhece RNA de dupla fita) e TLR7 (reconhece RNA de fita simples) são os principais TLRs envolvidos no reconhecimento de flavivírus (NAZMI *et al.*, 2014). Porém, o envolvimento de outros TLRs vem sendo estudado e já foi demonstrado que a proteína NS1 de DENV ativa TLR2 em células mononucleares do sangue periférico (CHEN; NG; CHU, 2015). Na figura 11 deste trabalho também foi demonstrado que ZIKV ativa TLR2. Também foi demonstrado que a infecção por DENV induz a liberação de DNA mitocondrial (mtDNA) no citosol, o que ativa TLR9 (LAI *et al.*, 2018). Mas o papel destes TLRs na infecção por flavivírus ainda não está elucidado. Para avaliar o envolvimento de TLR2 e TLR9 na infecção por ZIKV, camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> foram infectados via IC com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766. Os camundongos foram monitorados e pesados diariamente durante 21 dias.

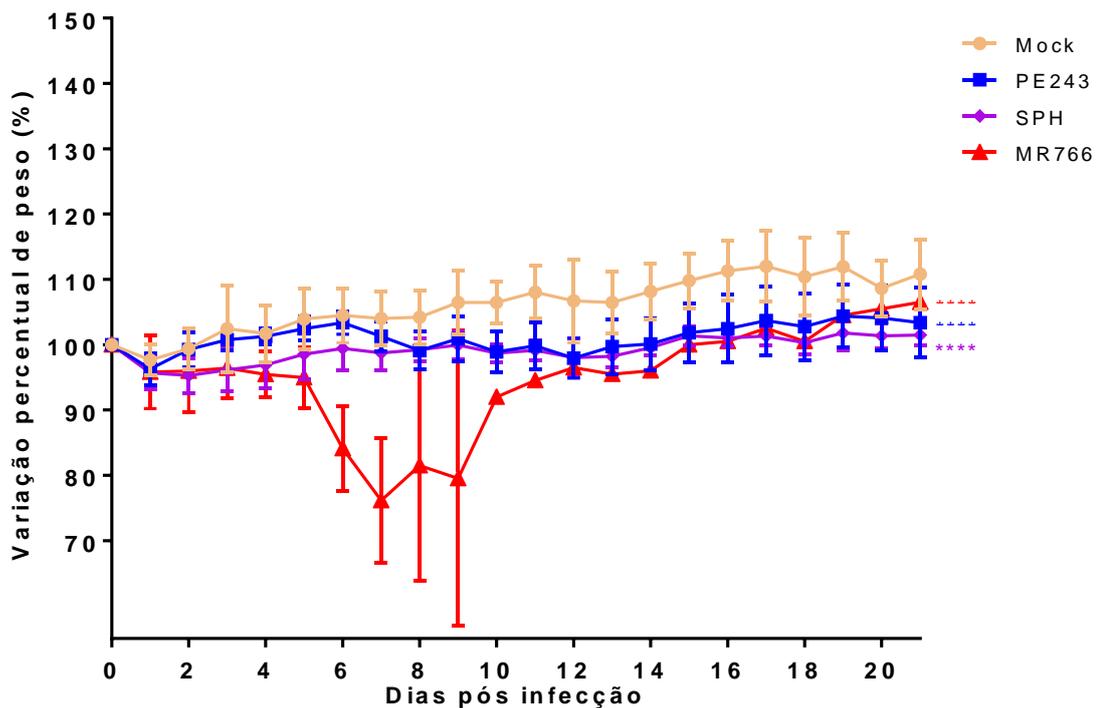


**Figura 25: Curva de sobrevivência em camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> de 8 a 10 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> foram infectados pela via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6 ♂ / 1 ♀), SPH (n = 6 ♂) e MR766 (n = 3 ♂ / 4 ♀). Como controle (n = 4 ♂ / 3 ♀) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A análise estatística foi feita com o teste Logrank. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparados com grupo controle (mock).

Os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> infectados com MR766 apresentaram sinais clínicos e taxa de sobrevivência de aproximadamente 20% (Figura 25). Os sinais clínicos iniciaram no 5º d.p.i. com conjuntivite, leve arqueamento do dorso e eriçamento de pelos. Os sinais foram progredindo até o 7º d.p.i. quando a maioria já apresentava paralisia, tremores e perda de peso acentuada, sendo eutanasiados. Um camundongo teve uma evolução um pouco mais tardia, apresentando sinais mais graves e sendo eutanasiado no 9º d.p.i. Um camundongo não apresentou os sinais clínicos mais graves, somente perda de peso, mas recuperou o peso e sobreviveu à infecção (Figuras 25 e 26). Quando comparados aos camundongos C57BL/6, 75% dos camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> foram eutanasiados no 7º d.p.i. (Figura 25), um dia antes do início dos óbitos dos camundongos C57BL/6 (Figura 18). Um camundongo TLR2/9<sup>-/-</sup> se recuperou da infecção (Figura 25), enquanto três camundongos C57BL/6 se recuperaram da infecção (Figura 18), porém, o número de animais utilizados na infecção dos C57BL/6 foi aproximadamente duas vezes maior que o número de animais utilizados na infecção dos TLR2/9<sup>-/-</sup>.

Camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH não apresentaram morte ou sinais clínicos, como os camundongos mock (Figura 25), mas apresentaram variação percentual do peso significativamente diferente quando comparados aos camundongos mock (Figura 26). Enquanto os camundongos mock ganharam

aproximadamente 10% do seu peso corporal, os camundongos infectados com ZIKV PE243 e SPH não ganharam peso (Figura 26). No 21<sup>o</sup> d.p.i., camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH apresentaram aproximadamente 10% a menos de peso em relação aos camundongos mock (Figura 26). A variação percentual de peso entre os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> mock (Figura 26) foi significativamente maior que a variação entre os camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 e os camundongos C57BL/6 mock, com  $p < 0,0001$  (Figura 26) e  $p < 0,01$  (Figura 19), respectivamente. A variação percentual de peso entre os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> infectados ZIKV SPH e os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> mock foi significativa (Figura 26), diferente da variação percentual de peso entre os camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV SPH e os camundongos C57BL/6 mock, que apresentaram um menor ganho de peso, embora não significativo estatisticamente (Figura 19).



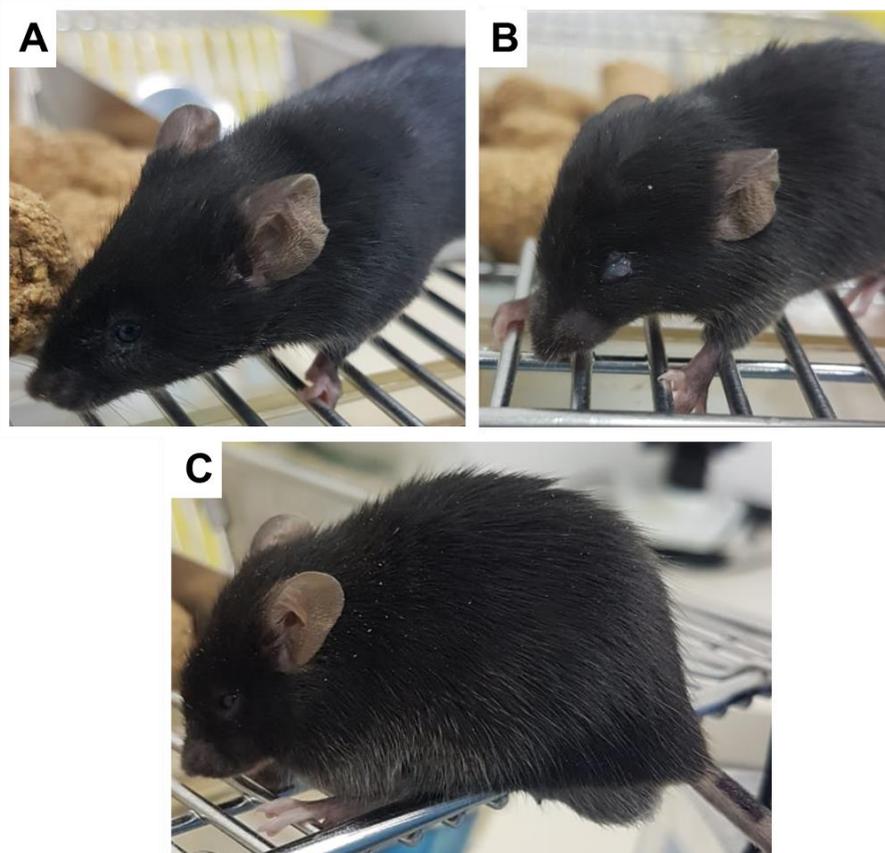
**Figura 26: Variação percentual de peso em camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> de 8 a 10 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> foram infectados pela via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 6 ♂ / 1 ♀), SPH (n = 6 ♂) ou MR766 (n = 3 ♂ / 4 ♀). Como controle (n = 4 ♂ / 3 ♀) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A variação percentual de peso em camundongos infectados via IC foi avaliada. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparados com grupo controle (mock).

A diferença na variação percentual de peso corporal entre os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> e MyD88<sup>-/-</sup> infectados com PE243, SPH e MR766 em relação ao mock foi similar, com p < 0,0001 (Figuras 26 e 23, respectivamente), e assim como os camundongos MyD88<sup>-/-</sup>, os camundongos TLR2/9<sup>-/-</sup> não apresentaram ganho de peso (Figuras 26 e 23, respectivamente).

Hayashida e colaboradores (2019) demonstraram que camundongos nocautes para genes no sistema imune, no caso, deficientes para o receptor IFN tipo I 1 (*ifnar1<sup>-/-</sup>*) e para o gene 1 de ativação de recombinação (*rag1<sup>-/-</sup>*), infectados via IC com a amostra de ZIKV MR766 perderam peso, apresentaram sinais neurológicos e tiveram que ser eutanasiados com 4 ou 5 e 8 dias, respectivamente.

### 5.1.2.3.3. Infecção por ZIKV em camundongos NOS2<sup>-/-</sup>

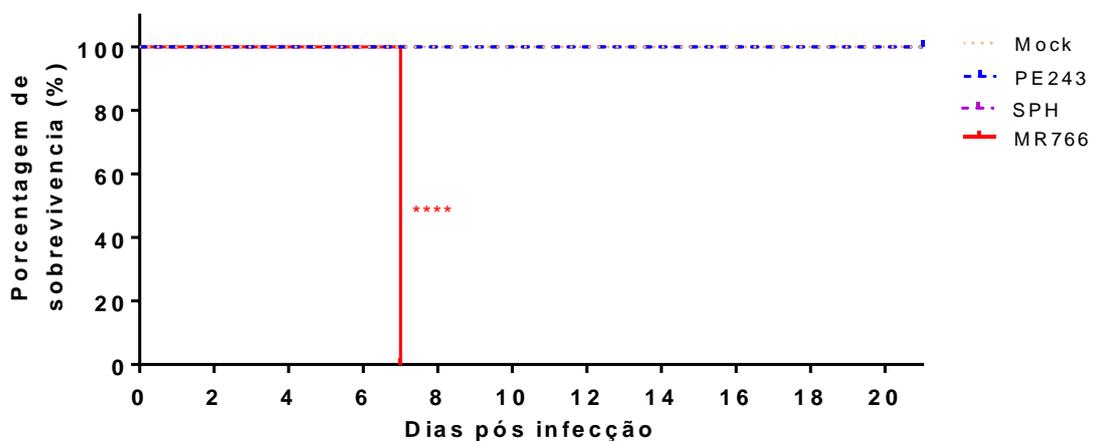
Dados anteriores do nosso grupo mostraram que camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados via IC com amostra de DENV não adaptada a camundongos apresentaram 100% de sobrevivência, nenhum sinal clínico ou perda de peso enquanto camundongos C57BL/6 apresentaram alta taxa de mortalidade e sinais clínicos como perda de peso, prostração, eriçamento dos pelos, arqueamento do dorso e paralisia (DE SOUZA *et al.*, 2013). Para avaliar se camundongos NOS2<sup>-/-</sup> também são resistentes a infecção por ZIKV, os camundongos foram infectados via IC com 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV PE243, SPH e MR766, pesados e monitorados diariamente durante 21 dias.



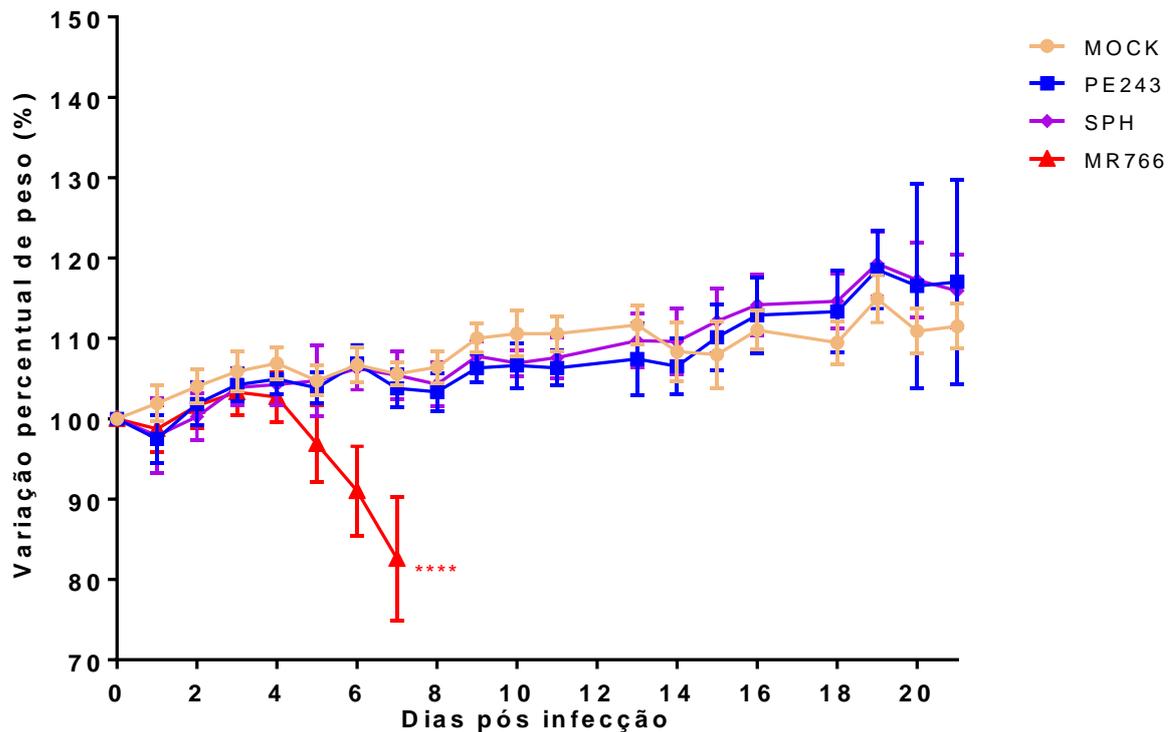
**Figura 27: Sinais clínicos apresentados por camundongos NOS<sup>-/-</sup> infectados com 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV MR766.** Camundongos NOS<sup>-/-</sup> infectados por via IC com 4x10<sup>2</sup> p.f.u. de ZIKV MR766 foram pesados e observados diariamente para avaliação dos sinais clínicos e mortalidade. **a)** Conjuntivite leve; **b)** Conjuntivite grave; **c)** Encurvamento do dorso e eriçamento de pelos.

Os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV MR766 começaram a apresentar sinais no 5<sup>o</sup> d.p.i, com conjuntivite leve (Figura 27a) que progrediu para conjuntivite grave no 7<sup>o</sup> d.p.i (Figura 27b). Os camundongos também apresentaram eriçamento de pelos e encurvamento do dorso (Figura 27c), perda de peso (Figura

29), tremores e paralisia. A perda de peso iniciou no 4º d.p.i. chegando a aproximadamente 20% no 7º d.p.i. (Figura 29). No 7º d.p.i., os camundongos já apresentavam paralisia bem avançada e muitos tremores, sendo assim eutanasiados (Figura 28). Os sinais clínicos nos camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados com MR766 foram de evolução mais rápida quando comparados aos camundongos C57BL/6, apresentando paralisia grave e sendo eutanasiados no 7º d.p.i. (Figura 28), enquanto camundongos C57BL/6 sobreviveram até o 12º d.p.i. e três camundongos C57BL/6 conseguiram se recuperar após a infecção (Figura 18).



**Figura 28: Curva de sobrevivência em camundongos NOS2<sup>-/-</sup> de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos NOS2<sup>-/-</sup> do sexo masculino foram infectados pela via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 7), SPH (n = 6) e MR766 (n = 7). Como controle (n = 7) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A análise estatística foi feita com o teste Logrank. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparados com grupo controle (mock).



**Figura 29: Variação percentual de peso em camundongos NOS2<sup>-/-</sup> de 8 semanas de idade submetidos a infecção intracraniana com ZIKV.** Camundongos NOS2<sup>-/-</sup> do sexo masculino foram infectados pela via intracraniana com  $4 \times 10^2$  p.f.u. de ZIKV PE243 (n = 7), SPH (n = 6) e MR766 (n = 7). Como controle (n = 7) foram utilizados camundongos inoculados com sobrenadantes de células C6/36 (mock). Os camundongos foram monitorados diariamente nos 21 dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos, alterações de peso corporal e mortalidade. A variação percentual de peso em camundongos infectados via IC foi avaliada. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparados com grupo controle (mock).

Todos os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH sobreviveram e não apresentaram sinais clínicos (Figura 28) nem tampouco apresentaram perda de peso, e ao contrário, ganharam peso assim como os camundongos mock e, no 21<sup>o</sup> d.p.i., estavam com aproximadamente 20% a mais de peso quando comparados ao dia 0 (Figura 29). Este achado foi diferente dos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243, que apresentaram significativa variação percentual de peso quando comparados aos camundongos mock (Figura 19) e dos camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV SPH, que apresentaram tendência a ganhar menos peso quando comparados aos camundongos mock (Figura 19). Desta forma podemos concluir que diferentemente dos resultados obtidos com inoculação de camundongos NOS2<sup>-/-</sup> com DENV não adaptado (DE SOUZA, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2013), os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV MR766, um vírus adaptado a camundongos, não apresentou nenhuma proteção. As duas amostras PE243 e SPH quando inoculadas em camundongos NOS2<sup>-/-</sup> não

apresentaram sintomas e nem redução de peso, comprovando a proteção. GOMES e colaboradores (2021) demonstraram que crianças com alelo mutado no SNP rs2297518 no gene *nos2* apresentaram maior risco de desenvolver síndrome congênita pelo Zika, o que também demonstra a importância de NOS2 nas infecções por ZIKV.

#### **5.1.2.4. Súmula dos resultados obtidos na infecção intracraniana em camundongos imunocompetentes e nocautes infectados com ZIKV**

Os resultados obtidos nas infecções de ZIKV via IC dos camundongos C57BL/6, MyD88<sup>-/-</sup>, NOS2<sup>-/-</sup> e TLR2/9<sup>-/-</sup> estão sumarizados na tabela 5.

**Tabela 5:** Infecção intracraniana com ZIKV em camundongos C57BL/6, *myd88*<sup>-/-</sup>, *nos2*<sup>-/-</sup> e *tlr2/9*<sup>-/-</sup>.

Camundongos		C57BL/6			MyD88 <sup>-/-</sup>			NOS2 <sup>-/-</sup>			TLR2/9 <sup>-/-</sup>			
ZIKV		PE243	SPH	MR766	PE243	SPH	MR766	PE243	SPH	MR766	PE243	SPH	MR766	
Mortalidade (%)		0	0	80	0	0	100	0	0	100	0	0	80	
Dia do óbito		-	-	8 - 12 <sup>o</sup>	-	-	8 <sup>o</sup>	-	-	7 <sup>o</sup>	-	-	7 - 9 <sup>o</sup>	
Variação de Peso (%) 7 <sup>o</sup> d.p.i.		104	109	95	98	96	90	104	105	81	101	99	76	
Variação de Peso (%) 14 <sup>o</sup> d.p.i.		110	115	102	94	99	-	107	110	-	100	100	96	
Conjuntivite		N	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N	S	
Eriçamento de pelos		N	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N	S	
Encurvamento do dorso		N	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N	S	
Paralisia		N	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N	S	
Citocinas	IL-12p70	ND	ND	ND	Soro (2)	ND	ND	-	-	-	-	-	-	
	IL-6	ND	ND	ND	ND	ND	Cérebro (2)	-	-	-	-	-	-	
	IL-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	
	MCP-1	ND	ND	ND	Cérebro (*)	ND	Cérebro (3)	-	-	-	-	-	-	
	TNF	Cérebro (3)	Fígado (3)	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
		Fígado (2)	Soro (2)					-	-	-	-	-	-	-
IFN-γ	Cérebro (4)	Cérebro (**)					-	-	-	-	-	-	-	
	Soro (2)	Fígado (*) Baço (**)	Cérebro (**)	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	
qPCR One-step	Cérebro	D	6	6	5	5	5	5	-	-	-	-	-	
		ND	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	
		IND	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	
	Fígado	D	4	5	1	0	0	1	-	-	-	-	-	
		ND	2	1	3	5	4	4	-	-	-	-	-	
		IND	0	0	1	0	1	0	-	-	-	-	-	
	Baço	D	6	6	3	4	3	3	-	-	-	-	-	
		ND	0	0	0	1	2	2	-	-	-	-	-	
		IND	0	0	2	0	0	0	-	-	-	-	-	
	Rim	D	5	3	4	2	1	1	-	-	-	-	-	
		ND	1	2	0	3	4	4	-	-	-	-	-	
		IND	0	1	1	0	0	0	-	-	-	-	-	
Testículo	D	3	4	4	1	0	1	-	-	-	-	-		

<b>ND</b>	2	1	0	3	2	3	-	-	-	-	-	-
<b>IND</b>	1	1	1	1	3	1	-	-	-	-	-	-

d.p.i.= dias pós infecção; D= Detectado; ND= Não detectado; IND= Indeterminado;

(\*) =  $p < 0,05$ ; (\*\*) =  $p < 0,01$ , N= não; S= sim. Os números entre parêntesis são o número de camundongos em que as citocinas foram detectadas e os asteriscos são \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$

A ausência de modelos murinos que reproduzam a infecção e as manifestações clínicas em humanos dificulta a compreensão da patogênese e da resposta imune contra ZIKV (PARDY *et al.*, 2017). Apesar da existência de alguns modelos animais, a maioria utiliza camundongos nocautes para genes da imunidade inata (BRADLEY; NAGAMINE, 2017; ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016; ZMURKO *et al.*, 2016), que não são ideais para o estudo da resposta imune. Neste trabalho foram utilizados camundongos imunocompetentes e foi feita infecção IC com amostras brasileiras de ZIKV não adaptadas, os resultados demonstraram que os ZIKV PE234 e SPH são capazes de infectar animais imunocompetentes pela via IC, os vírus são capazes de disseminar pelo organismo e induzir a resposta imune em outros órgãos. Porém, os camundongos não desenvolvem sinais neurológicos, demonstrando que estes vírus não se mostraram neurovirulentos nos camundongos C57BL/6. Fernandes e colaboradores (2017), demonstraram que camundongos Swiss inoculados por via SC ou IC com ZIKV SPH apresentaram letargia, ataxia e paralisia com evidência de infecção no cérebro. Todavia, no estudo citado, foram utilizados camundongos recém-nascidos de um dia de idade, os quais não possuem o sistema imune completamente desenvolvido, diferente dos nossos experimentos, em que foram utilizados camundongos adultos.

Os resultados também demonstram que as respostas desencadeadas pelas duas amostras brasileiras de ZIKV (PE234 e SPH) são diferentes em camundongos C57BL/6, já que os camundongos infectados com ZIKV PE243 ganharam significativamente menos peso e a detecção de citocinas nos órgãos foi completamente diferente, com ZIKV SPH estimulando significativamente IFN- $\gamma$  no cérebro, fígado e baço.

Apesar de não haver diferença na variação percentual de peso entre os camundongos MyD88 $^{-/-}$  infectados com ZIKV PE243 e SPH, a detecção da MCP-1 no cérebro dos camundongos infectados com ZIKV PE243 foi significativamente maior em comparação com a MCP-1 detectada no cérebro dos camundongos infectados com ZIKV SPH, demonstrando mais uma vez a diferença na resposta imune

desencadeada por estas duas amostras. Também foi observada diferença nas respostas entre os camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup>. MyD88 é uma proteína adaptadora envolvida na via de sinalização de todos os TLRs, com exceção do TLR3 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Os TLRs são um dos principais receptores que contribuem para a detecção eficaz de flavivírus (SERMAN; GACK, 2019). O recrutamento de MyD88 induz a resposta imune inata através da produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010; SAIKH, 2021). Nos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> avaliados neste trabalho, após infecção por ZIKV, foram detectados IL12p70, IL-6 e MCP-1, citocinas que não foram detectadas nos camundongos C57BL/6, nos quais foram detectadas somente TNF e IFN- $\gamma$ . Este resultado demonstra que a ausência da proteína MyD88 desencadeia uma resposta imune distinta nos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> quando comparados aos camundongos imunocompetentes.

Camundongos nocautes para genes da imunidade inata (TLR2/9<sup>-/-</sup> e MyD88<sup>-/-</sup>) infectados com ZIKV PE243 e SPH por via IC ganharam significativamente menos peso em comparação com os camundongos mock, indicando a importância do sistema imune inato na infecção por ZIKV. O que corrobora com outros estudos publicados com camundongos nocautes para genes da resposta imune (BRADLEY; NAGAMINE, 2017; ALIOTA et al., 2016; DOWALL et al., 2016; Lazear et al., 2016; ROSSI et al., 2016; ZMURKO et al., 2016). Já camundongos NOS2<sup>-/-</sup> não apresentaram sinais e nem perda de peso quando infectados com ZIKV PE243 e SPH. Mas, quando infectados com ZIKV MR766, houve 100% de mortalidade, demonstrando que, diferente do que ocorre com a amostra não adaptada de DENV (DE SOUZA et al., 2013, DE SOUZA, 2012), a ausência de NOS2 não oferece proteção contra a infecção por ZIKV MR766.

Quanto à amostra ZIKV MR766, todos os camundongos inoculados via IC, imunocompetentes e nocautes, mostraram alta mortalidade, variação de peso acentuada e sinais clínicos, principalmente de infecção no SNC, o que era esperado e está de acordo com dados da literatura, já que é uma amostra que foi multiplicada diversas vezes em cérebro de camundongos e é adaptada a estes animais (DICK, 1952b; HAYASHIDA et al., 2019). Nazerai e colaboradores (2018), demonstraram que camundongos C57BL/6 imunocompetentes de 7 a 10 semanas de idade, inoculados via IC com 1 x 10<sup>2</sup>, 1 x 10<sup>3</sup> ou 1 x 10<sup>4</sup> p.f.u. de ZIKV MR766 apresentaram perda de

peso começando por volta do 4º d.p.i., que progrediu para doença grave no 8º d.p.i., tempo em que os camundongos perderam mais de 25% de seu peso inicial e foram eutanasiados.

## **5.2. Infecção e imunidade inata em crianças: ZIKV e DENV**

A resposta imune inata é importante para o controle de infecções virais, pois se a infecção não for contida nesta etapa, o vírus pode disseminar para outros tecidos, incluindo o SNC (SINGH, H.; KOURY, 2021). As infecções de SNC são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças em todo o mundo e as infecções virais superam as infecções bacterianas, fúngicas e por protozoários (Kennedy, 2004; Marinho et al., 2021). O nosso grupo desenvolveu uma plataforma de diagnóstico para meningoencefalites virais por PCR em tempo real (OLIVEIRA, 2015) e desde então vem pesquisando os agentes etiológicos de meningoencefalites em crianças. Os flavivírus são conhecidos como vírus capazes de infectar o SNC e estudos do nosso grupo identificaram flavivírus em líquido cefalorraquidiano (MARINHO; KROON, 2019; MARINHO et al., 2021), incluindo YFV (MARINHO et al., 2019), DENV (OLIVEIRA et al., 2017; MARINHO et al., 2017) e ZIKV (MARINHO et al., 2019). A infecção no SNC resulta em inflamação das meninges, cérebro e medula espinhal, causando a liberação de várias citocinas (SINGH, H.; KOURY, 2021).

Apesar do reconhecido potencial neurotrópico e neurovirulento dos flavivírus, o conhecimento sobre os mecanismos de neuropatogênese ainda é escasso (MUSTAFÁ et al., 2019). Para avaliar o impacto da resposta imune inata em crianças infectadas com ZIKV e DENV com manifestações de SNC foram avaliados polimorfismos em genes de sistema imune inato da via TLR e o LCR foi utilizado para detecção de citocinas envolvidas na resposta imune.

### **5.2.1. Detecção de SNP e quantificação de citocinas em LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV**

O DNA de crianças com manifestações de SNC, infectadas com ZIKV confirmado por RT-PCR, foi analisado por sequenciamento para detecção de SNP em genes envolvidos na resposta imune inata. Assim, foram analisados:

- (i) dois SNPs no gene *tlr3*, rs3775291 (SANTOS, 2018) e rs5743316 (BIYANI *et al.*, 2015), denominados TLR3a (C>T) (n = 17) e TLR3b (A>T) (n = 18), respectivamente,
- (ii) SNP rs179008 no gene *tlr7* (n = 19) (A>T) (MUKHERJEE; TRIPATHI, 2019),
- (iii) SNP rs8177374 no gene *tirap* (C>T) (n = 19) (ALAGARASU *et al.*, 2015),
- (iv) SNP rs387907272 no gene *myd88* (T>C) (n = 18) (CHANG *et al.*, 2016),
- (v) SNP rs61942233 no gene *oas3* (C>T) (n = 19) (DUTTA; TRIPATHI, 2017) e
- (vi) SNP rs1024611 no gene *mcp-1* (n = 17) (A>G) (CHOWDHURY; KHAN, 2017).

Os dados das crianças analisadas estão apresentados na tabela 6.

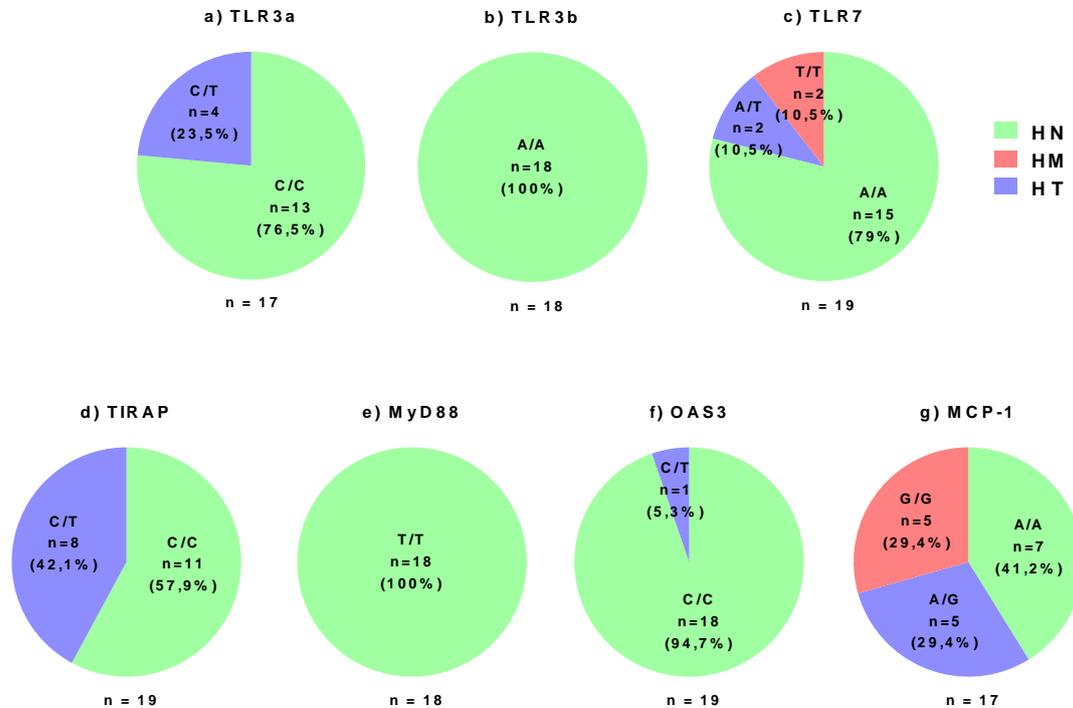
**Tabela 6:** Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.

Amostra	Idade	Sexo	Cidade	Início dos sintomas	Coleta LCR	Desfecho clínico
512	12 anos	M	Santa Luzia	03/03/2015	08/03/2015	Alta
619	7 anos	M	Nova Lima	02/11/2015	12/11/2015	Alta
740	5 anos	M	Belo Horizonte	16/07/2017	27/07/2017	Alta
762	1 mês	M	Belo Horizonte	21/11/2017	22/11/2017	Alta
816	2 anos	M	SD	26/11/2017	09/12/2017	Alta
818	3 meses	M	Presidente Juscelino	26/10/2017	01/11/2017	Alta
846	3 anos	M	Belo Horizonte	10/05/2018	14/05/2018	Alta
847	1 ano	M	Belo Horizonte	12/01/2018	17/01/2018	Alta
898	11 anos	M	SD	Febre desde agosto	06/12/2017	Alta
1013	8 meses	M	Belo Horizonte	06/07/2018	10/07/2018	Alta
1024	1 ano	F	Belo Horizonte	07/06/2018	08/06/2018	Alta
1025	7 meses	M	Belo Horizonte	18/11/2018	20/11/2018	Alta
1032	SD	SD	SD	SD	SD	SD
1054	6 anos	M	Belo Horizonte	06/09/2018	07/09/2018	Alta
1078	7 meses	F	Belo Horizonte	09/08/2018	10/08/2018	Alta
1137	15 dias	M	Contagem	16/02/2019	24/02/2019	Alta
1150	1 mês	M	Belo Horizonte	05/05/2019	09/05/2019	Alta
1230	3 anos	F	Belo Horizonte	06/07/2019	12/07/2019	Alta
1242	4 meses	M	SD	14/11/2019	21/11/2019	Óbito

F = feminino, M = masculino, SD = sem dados.

A maioria das crianças pertencem ao sexo masculino e moram em Belo Horizonte. A maioria das amostras foram coletadas no ano de 2018, sendo sete de 19

amostras. A idade é variada, desde 15 dias até 12 anos. Apenas uma criança faleceu (1242) e uma não possuía prontuário (1032).



**Figura 30: Detecção de SNP em crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.** O DNA extraído do LCR de crianças infectadas com ZIKV com manifestações de SNC foram utilizados como molde para amplificação, com iniciadores específicos para a detecção de SNPs, por sequenciamento, nos genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *myd88*, *oas3* e *mcp-1*. As análises foram feitas utilizando-se os softwares Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) e novoSNP (Department of Molecular Genetics - VIB and University of Antwerp). **a)** TLR3a: SNP rs3775291 no gene *tlr3* (C>T) (n = 17), **b)** TLR3b: SNP rs5743316 no gene *tlr3* (A>T) (n = 18), **c)** TLR7: SNP rs179008 no gene *tlr7* (A>T) (n = 19), **d)** TIRAP: SNP rs8177374 no gene *tirap* (C>T) (n = 19), **e)** MyD88: SNP rs387907272 no gene *myd88* (T>C) (n = 18), **f)** OAS3: SNP rs61942233 no gene *oas3* (C>T) (n = 19), **g)** MCP-1: SNP rs1024611 no gene *mcp-1* (A>G) (n = 17). HN = Homozigoto normal, HT = Heterozigoto. HM = Homozigoto mutado.

Para o SNP TLR3a foram analisadas 17 amostras e quatro foram HT (Figura 30a). Foram analisadas 19 amostras para o SNP TLR7 sendo que duas amostras foram HT e duas foram HM (Figura 30c). Para o SNP TIRAP foram analisadas 19 amostras e oito amostras foram HT (Figura 30d). Das 19 amostras analisadas para o SNP OAS3 somente uma amostra foi HT (Figura 30f). Para o SNP MCP-1 foram analisadas 17 amostras, cinco foram HM, cinco foram HT (Figura 30g). Os SNPs TLR3b e MyD88 não foram detectados nas amostras analisadas (Figuras 30b e 30e).

A frequência dos alelos de cada SNP foi calculada e está apresentada na tabela 4, junto com as frequências observadas nas populações globais e americanas de diferentes estudos registradas no banco de dados GenBank.

Para o SNP TLR3a, a frequência do alelo mutado (T) encontrada nos pacientes positivos para ZIKV foi menor que a frequência observada nas populações globais e americanas dos diferentes estudos (Tabela 7). Os SNPs TLR7 e OAS3 apresentaram frequências semelhantes às frequências globais e americanas (Tabela 7). Para o SNP TIRAP, a frequência do alelo mutado (T) encontrada nos pacientes positivos para ZIKV foi superior à frequência observada nas populações globais e americanas dos estudos (Tabela 7). O SNP MCP-1 apresentou a frequência do alelo mutado (G) nas amostras positivas para ZIKV superior às frequências observadas nas populações globais dos diferentes estudos mas foi semelhante às frequências das populações americanas (Tabela 7). Não foram detectadas mutações nos SNP TLR3b e MyD88 nas amostras positivas para ZIKV, a frequência do alelo mutado foi 0, o que é semelhante às populações globais e americanas dos diferentes estudos (Tabela 7).

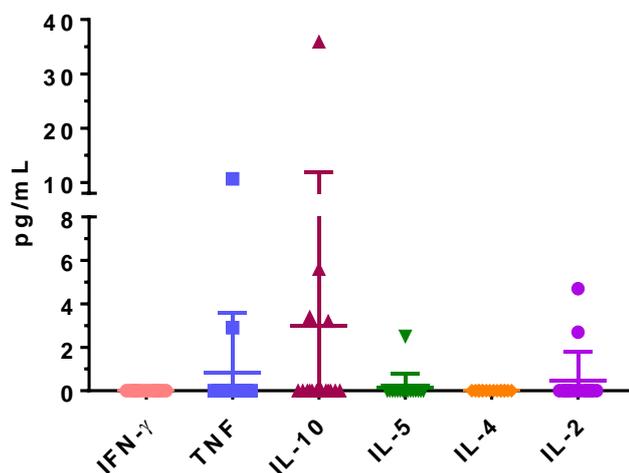
**Tabela 7:** Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes positivos para ZIKV versus frequências do dbSNP.

SNP	Frequências	Alelo	
		Normal	Mutado
TLR3a	Global ALFA	C = 0.72	T = 0.28
	Global 1000genomes	C = 0.77	T = 0.23
	Global gnomAD	C = 0.76	T = 0.24
	Americana 1000genomes	C = 0.695	T = 0.305
	Americana gnomAD	C = 0.71	T = 0.29
	ZIKV	C = 0.88	T = 0.12
TLR3b	Global ALFA	A = 0.99992	T = 0.00008
	Global 1000genomes	SD	SD
	Global gnomAD	A = 0.999964	T = 0.000036
	Americana 1000genomes	SD	SD
	Americana gnomAD	A = 1	T = 0
	ZIKV	A = 1	T = 0
TLR7	Global ALFA	A = 0.80	T = 0.20
	Global 1000genomes	A = 0.88	T = 0.12
	Global gnomAD	A = 0.81	T = 0.19
	Americana 1000genomes	A = 0.79	T = 0.21
	Americana gnomAD	A = 0.79	T = 0.21
	ZIKV	A = 0.84	T = 0.16
TIRAP	Global ALFA	C = 0.85	T = 0.15
	Global 1000genomes	C = 0.91	T = 0.09
	Global gnomAD	C = 0.89	T = 0.11
	Americana 1000genomes	C = 0.91	T = 0.09
	Americana gnomAD	C = 0.90	T = 0.10
	ZIKV	C = 0.79	T = 0.21
MyD88	Global ALFA	T = 0.99981	C = 0.00019
	Global 1000genomes	T = 0.9998	C = 0.0002
	Global gnomAD	T = 0.999993	C = 0.000007
	Americana 1000genomes	T = 1	C = 0
	Americana gnomAD	T = 0.99993	C = 0.00007
	ZIKV	T = 1	C = 0
OAS3	Global ALFA	C = 0.985	T = 0.015
	Global 1000genomes	C = 0.995	T = 0.005
	Global gnomAD	C = 0.99	T = 0.01
	Americana 1000genomes	C = 0.994	T = 0.006
	Americana gnomAD	C = 0.993	T = 0.007
	ZIKV	C = 0.97	T = 0.03
MCP-1	Global ALFA	A = 0.72	G = 0.28
	Global 1000genomes	A = 0.64	G = 0.36
	Global gnomAD	A = 0.72	G = 0.28
	Americana 1000genomes	A = 0.51	G = 0.49
	Americana gnomAD	A = 0.57	G = 0.43
	ZIKV	A = 0.56	G = 0.44

Fonte: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Ainda existem poucos estudos que relacionam SNPs em genes da imunidade inata e infecções por ZIKV. Santos e colaboradores (2019) demonstraram que o alelo mutado do SNP rs3775291 no gene *tlr3* foi mais frequente e associado às mães com bebês com síndrome congênita pelo ZIKV. Santos e colaboradores (2019) também demonstraram que o alelo mutado do SNP rs1799964 no gene *tnfa* nos recém-nascidos foi associado à microcefalia grave. Estes SNPs não foram analisados no nosso trabalho, mas foram analisados outros SNPs relacionados à resposta imune, inclusive SNPs no gene *tlr3*, e um deles apresentou frequência menor às frequências do banco de dados dbSNP. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ e colaboradores (2021) fizeram um estudo no México e demonstraram que a população que apresenta o alelo mutado do SNP rs10774671 no gene *oas1* é geneticamente suscetível às doenças por vírus RNA.

O LCR de crianças infectadas com ZIKV foi analisado por citometria de fluxo com o kit Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences) para quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-5, IL-4, IL-2. Foram utilizadas 16 amostras de LCR positivos para ZIKV, pois na data da realização do CBA, as amostras 816, 898 e 1242 ainda não haviam sido triadas.



**Figura 31: Detecção de citocinas no LCR de crianças com manifestações de SNC e infectadas com ZIKV.** LCR positivo para ZIKV (n = 16) de crianças internadas com manifestações de SNC no HIJPII/FEHMIG foi analisado por citometria de fluxo com o kit Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences) para quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-5, IL-4, IL-2. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite de detecção não foram apresentadas na figura.

Nenhuma das citocinas foram detectadas em 11 das 16 amostras de LCR (Tabela 8). A citocina IL-10 foi detectada em quatro amostras de LCR com uma com alta concentração, sendo que todas estas as crianças apresentam SNPs, uma nos

genes *tlr3* e *tlr7*, duas no gene *tirap* e uma no gene *tlr3* (Figura 31 e Tabela 8). TNF foi detectada em 2 amostras que apresentam SNPs nos genes *tirap* e *mcp-1*, e foi a segunda citocina com maior concentração (Figura 30 e Tabela 8). IL-2 também foi detectada em duas amostras, mas em concentração inferior a 5 pg/mL sendo que as duas amostras apresentam SNPs no gene *tirap* (Figura 30 e Tabela 8). IL-5 foi detectada em uma amostra que apresenta SNP no gene *tirap* e foi encontrada em baixa concentração (Figura 30 e Tabela 8). IFN- $\gamma$  e IL-4 não foram detectadas nas amostras analisadas (Figura 30 e Tabela 8).

SÁNCHEZ-ARCILA e colaboradores (2019) analisaram o soro de pacientes infectados com ZIKV na fase aguda e não detectaram aumento na produção de IFN- $\gamma$ , assim como IFN- $\gamma$  não foi detectado no LCR das crianças analisadas. Sánchez-Arcila e colaboradores (2019) detectaram aumento na produção de TNF- $\alpha$  e neste trabalho, duas crianças apresentaram TNF no LCR. Tappe e colaboradores (2015) detectaram aumento de IL-2, IL-4 e IL-10 no soro de pacientes infectados com ZIKV, destas, somente IL-4 não foi detectada no LCR das crianças analisadas neste trabalho. Tappe e colaboradores (2015) não detectaram diferença a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

GALLIEZ e colaboradores (2016), detectaram aumento de IL-6 e IL-8 no LCR de um paciente brasileiro de 26 anos infectado com ZIKV, durante a fase aguda da doença, com o paciente apresentando tetraparesia e insuficiência respiratória. Estas citocinas não foram pesquisadas neste trabalho, mas foram pesquisadas outras citocinas que também são pro-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-5, IL-4 e IL-2.

NASCIMENTO-CARVALHO e colaboradores (2021), examinaram a expressão de 29 proteínas solúveis mediadoras da inflamação e detectaram aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios no LCR, como IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-15, IL-17A, IFN- $\gamma$  e MIP-1 $\alpha$  (CCL3), em recém-nascidos com microcefalia expostos ao ZIKV, já recém-nascidos expostos ao ZIKV que não apresentaram microcefalia, apresentaram tendência em diminuir as concentrações de mediadores inflamatórios, como IL-2, IL-4, IL-12p40, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Destes, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2 e IL-4 também foram analisados em nosso trabalho, sendo IFN- $\gamma$  e IL-4 não foram detectados em nenhum LCR e TNF e IL-2 foram detectados em poucos LCRs e em baixa concentração.

SALGADO e colaboradores (2019) avaliaram plasma e LCR de crianças com provável encefalite, e, em comparação com controles saudáveis, crianças com encefalite associada ao ZIKV apresentaram baixa concentração de IL-10 no plasma, mas não de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$  ou TNF-  $\alpha$ . Já no LCR foram detectados níveis elevados de IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ . IL-10 também foi detectado em 4 amostras de LCR deste trabalho, sendo a citocina com maior concentração. Já IFN- $\gamma$  não foi detectado em nenhum LCR deste trabalho.

Os resultados da quantificação de citocinas no LCR e a detecção de polimorfismos nas amostras de ZIKV estão apresentados em conjunto na tabela 8. Na tabela 9 estão apresentados os dados citoquímicos dos LCRs dos pacientes.

**Tabela 8:** Detecção de SNP e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com ZIKV.

Amostra	SNP							Citocinas (pg/mL)					
	TLR3a	TLR3b	TLR7	TIRAP	MyD88	OAS3	MCP-1	IFN- $\gamma$	TNF	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
512	HT	HN	HM	HN	HN	HN	HN	ND	ND	35,9	ND	ND	ND
619	HN	HN	HN	HT	HN	HN	HN	ND	10,7	3,2	2,5	ND	4,7
740	HT	HN	HN	HT	HN	HN	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
762	HN	HN	HN	HT	HN	HN	HM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
816	HN	HN	HN	HT	HN	HN	HN	NF	NF	NF	NF	NF	NF
818	NF	NF	HN	HN	NF	HN	HM	ND	2,9	ND	ND	ND	ND
846	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
847	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
898	HT	HN	HN	HN	HN	HN	HM	NF	NF	NF	NF	NF	NF
1013	HN	HN	HN	HT	HN	HN	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1024	HN	HN	HT	HT	HN	HN	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1025	HN	HN	HM	HN	HN	HN	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1032	NF	HN	HT	HN	HN	HT	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1054	HN	HN	HN	HT	HN	HN	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1078	HN	HN	HN	HT	HN	HN	HN	ND	ND	5,6	ND	ND	2,7
1137	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1150	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1230	HT	HN	HN	HN	HN	HN	HN	ND	ND	3,4	ND	ND	ND
1242	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HM	NF	NF	NF	NF	NF	NF

ND = não detectado, HN = Homozigoto normal, HT = Heterozigoto, HM = Homozigoto mutado, NF = não feito.

Com exceção da amostra 1137, todas as amostras positivas para ZIKV apresentaram SNPs em algum dos genes analisados (Tabela 8). Dez amostras apresentaram mutação em um gene, sete amostras apresentaram mutação em dois genes e a amostra 1024 apresentou mutação em três genes, ela foi HT para *tlr7*, *tirap* e *mcp-1*, não houve detecção de nenhuma citocina nesta amostra (Tabela 8) e o LCR não apresentou alterações (Tabela 9).

Na amostra 619, na qual foi detectado o maior número de citocinas (Tabela 8), o LCR apresentou aumento na celularidade, glicose e proteínas (Tabela 9) e ela foi HT para o SNP TIRAP (Tabela 8). A amostra 1078 também foi HT para o SNP TIRAP, foram detectadas IL-10 e IL-2 (Tabela 8) e o LCR apresentou porcentagem de linfócitos menor e de monócitos maior em relação aos valores de referência do HIJPII (Tabela 9). A amostra 512 foi HT para o SNP TLR3a e HM para o SNP TLR7 e só foi detectada IL-10, na maior concentração observada (Tabela 8). O LCR da amostra 512 apresentou celularidade aumentada, com alta porcentagem de neutrófilos, e valores de proteína e lactato também aumentados (Tabela 9). A amostra 818 foi HM para o

SNP MCP-1 e foi detectado TNF em baixa concentração (Tabela 8), o LCR apresentou celularidade levemente aumentada e alta porcentagem de neutrófilos (Tabela 9). A amostra 1230 foi HT para o SNP TIRAP e foi detectado IL-10 em baixa concentração (Tabela 8), o LCR desta amostra não apresentou alterações (Tabela 9).

**Tabela 9:** Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com ZIKV.

Amostra	Citologia					Exames Bioquímicos		
	Leuc. (/mm <sup>3</sup> )	Linf. (%)	Mon. (%)	Neut. (%)	Outros (%)	Glicose (mg/dL)	Proteína (mg/dL)	Lactato (mmol/L)
Valores de referência	0 - 5	70 - 100	30%	-	-	40 - 70	12 - 60	0,6 - 2,2
512	<b>119</b>	44	15	41	0	39	<b>75</b>	<b>3,5</b>
619	<b>42</b>	89	4	7	0	<b>80</b>	<b>723</b>	<b>2,8</b>
740	2	88	11	1	0	52	11	1,3
762	7	76	13	5	2 (EO)	47	<b>66</b>	1,1
816	<b>23</b>	82	17	-	-	45	35	1,3
818	<b>14</b>	42	15	41	2 (EO)	47	51	1
846	1	100	0	0	0	<b>88</b>	13	1,1
847	1	100	0	0	0	59	14,2	1,2
898	<b>17</b>	70	26	0	4 (MO)	35	42	1,4
1013	1	96	0	4	0	59	38	1
1024	1	100	0	0	0	58	15	1,1
1025	1					51	23	1
1032	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
1054	1	84	12	2	2 (MO)	59	<10	1,4
1078	2	56	<b>44</b>	0	0	52	24	1,4
1137	3	86	10	4	0	53	57	1
1150	0	100	0	0	0	52	29	1,5
1230	5	100	0	0	0	57	13	1,1
1242		40	<b>52</b>				20	7

SD = sem dados, Leuc. = leucócitos, Linf. = linfócitos, Mon. = monócitos, Neut. = neutrófilos, MO = macrófago, EO = eosinófilo.

IL-10 foi citocina mais detectada e possui atividade anti-inflamatória, desempenhando um papel central na regulação da resposta imune do hospedeiro a patógenos, prevenindo danos ao hospedeiro e mantendo a homeostase do tecido (IYER, CHEN, 2012). A amostra 512 apresentou a maior quantificação de IL-10 (35,9 pg/mL) (Tabela 8), o que pode estar relacionado à tentativa de controle da resposta

imune, já que esta amostra apresentou o LCR com maior celularidade e outros valores alterados (Tabela 9).

Também foi detectado IL-10 na amostra 619, mas em menor concentração (3,2 pg/mL) (Tabela 8), esta amostra também apresentou celularidade aumentada no LCR e valores alterados de glicose, proteína e lactato (Tabela 9). Na amostra 619, também foram detectados TNF e IL-5 (Tabela 8), que são citocinas pró-inflamatórias, o que pode explicar os valores alterados do LCR (Tabela 9). TNF é importante na defesa do hospedeiro e nas respostas inflamatórias, mas pode desencadear a morte celular e a degeneração dos tecidos (PROBERT, 2015). IL-5 é uma citocina pro-inflamatória envolvida no desenvolvimento e liberação de eosinófilos da medula óssea, aumenta a adesão dos eosinófilos às células endoteliais, melhora a função efetora e prolonga a sobrevivência (TAKATSU, 1993; TAKATSU; KOURO; NAGAI, 2009). E ainda, na amostra 619 também foi detectada IL-2, uma citocina pleiotrópica que promove a expansão, diferenciação e morte de células T ativadas e induz células T reguladoras, controlando a resposta imune, limitando as reações imunes inadequadas (ASAO, 2014). A detecção de IL-2 e IL-10 podem demonstrar uma tentativa de regulação da resposta imune deste paciente.

### **5.2.2. Detecção de SNP no gene *tirap* e quantificação de citocinas em LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV**

Para a detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* e para a quantificação de citocinas em LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV foi analisado o DNA de 38 crianças e o LCR de 61 crianças, respectivamente. A identificação do sorotipo de DENV infectante foi feita por semi-nested PCR. Os resultados da análise do SNP estão apresentados em número total de crianças infectadas com DENV (n = 38), sem distinção de sorotipos, e divididas por sorotipo e coinfeção, sendo 13 amostras de crianças infectadas com DENV-1, 14 com DENV-2, 5 com DENV-3, 3 com DENV-4 e 3 de coinfeções, com 2 de DENV-1/2 e 1 de DENV-1/3.

Nas tabelas 10, 11, 12, 13 e 14 estão apresentados os dados das crianças analisadas, separados por sorotipo.

**Tabela 10:** Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-1.

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Início dos sintomas</b>	<b>Coleta LCR</b>	<b>Desfecho clínico</b>
100	1 ano	F	Vespasiano	23/08/2014	24/08/2014	Alta
661	2 anos	F	Belo Horizonte	12/02/2016	18/02/2016	Alta
843	3 meses	M	Belo Horizonte	25/04/2018	03/05/2018	Alta
1015	3 meses	F	Belo Horizonte	13/06/2018	14/06/2018	Alta
1018	1 mês	F	Ribeirão das Neves	25/11/2018	26/11/2018	Alta
1043	3 anos	M	Santa Luzia	15/01/2019	18/01/2019	Alta
1049	4 meses	M	Ribeirão das Neves	13/06/2018	14/06/2018	Óbito
1076	10 meses	M	Guanhães	03/06/2018	08/06/2018	Alta
1099	13 anos	F	Santa Luzia	06/12/2018	08/01/2019	Alta
1105	3 anos	M	Sabará	11/01/2019	14/01/2019	Alta
1116	8 dias	F	Santa Luzia	18/01/2019	19/01/2019	Alta
1129	10 meses	M	Belo Horizonte	18/01/2019	21/01/2019	Alta
1164	11 meses	F	Sabará	25/02/2019	26/02/2019	Alta
1170	2 anos	M	Santa Luzia	16/02/2019	19/02/2019	Alta
1193	10 meses	M	SD	03/02/2019	12/02/2019	Alta

F = feminino, M = masculino, SD = sem dados.

Sete crianças infectadas com DENV-1 são do sexo feminino e oito crianças são do sexo masculino. A maioria das amostras analisadas são da região metropolitana de Belo Horizonte e dos anos de 2018 e 2019. A idade variou entre 8 dias e 13 anos, mas a maioria tinha meses ou poucos anos de idade. A maioria das crianças recebeu alta, somente uma faleceu (1049) (Tabela 10).

**Tabela 11:** Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-2.

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Início dos sintomas</b>	<b>Coleta LCR</b>	<b>Desfecho clínico</b>
575	9 meses	F	Belo Horizonte	31/12/2014	07/01/2015	Alta
577	SD	SD	SD	SD	SD	SD
579	29 dias	M	Belo Horizonte	11/06/2015	15/06/2015	Alta
606	4 meses	M	Sabará	24/09/2014	29/09/2014	Alta
806	3 anos	M	Santa Luzia	13/11/2018	14/11/2018	Alta
839	3 anos	F	Ribeirão das Neves	15/08/2018	17/09/2018	Alta
848	SD	SD	SD	SD	SD	SD
1009	5 anos	F	Ouro Branco	01/08/2018	22/08/2018	Alta
1033	1 ano	M	Belo Horizonte	24/06/2018	27/06/2018	Alta
1034	2 meses	M	Belo Horizonte	06/10/2018	10/10/2018	Transferência
1058	1 ano	M	Pará de Minas	03/08/2018	20/08/2018	Alta
1066	5 meses	F	Santa Luzia	11/10/2018	12/10/2018	Alta
1067	5 anos	M	Vespasiano	07/07/2018	16/07/2018	Alta
1103	1 mês	F	Sabará	16/02/2019	18/02/2019	Alta
1123	4 meses	M	Santa Luzia	05/01/2019	09/01/2019	Alta
1159	8 meses	M	Belo Horizonte	01/01/2019	05/01/2019	Alta
1192	4 meses	M	Belo Horizonte	24/01/2019	04/02/2019	Alta
1199	1 mês	F	Santa Luzia	17/06/2019	25/06/2019	Alta
1207	1 ano	M	Betim	25/06/2019	04/07/2019	Alta

F = feminino, M = masculino, SD = sem dados.

A maioria das crianças infectadas com DENV-2 são do sexo masculino, possuem até um ano idade, moram na região metropolitana de Belo Horizonte. A maioria das amostras foram coletadas nos anos de 2019 e 2018. A maioria das crianças receberam alta, uma foi transferida (1034) e duas não tivemos acesso ao prontuário (577 e 848) (Tabela 11).

**Tabela 12:** Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-3.

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Início dos sintomas</b>	<b>Coleta LCR</b>	<b>Desfecho clínico</b>
544	1 ano	F	Sabará	27/09/2014	03/10/2014	Alta
572	5 meses	M	Belo Horizonte	15/05/2015	17/05/2015	Alta
584	2 meses	M	Ribeirão das Neves	15/07/2015	17/07/2015	Alta
595	SD	SD	SD	SD	SD	SD
609	4 anos	M	Sabará	07/10/2014	08/10/2014	Alta
620	10 meses	M	Matozinhos	20/10/2015	24/10/2015	Alta
633	3 meses	M	Alvorada	05/04/2016	09/04/2016	Alta
1048	3 meses	F	Belo Horizonte	13/06/2019	15/06/2019	Alta
1125	3 anos	M	Belo Horizonte	01/06/2019	02/06/2019	Alta
1152	5 anos	M	Pedro Leopoldo	16/04/2019	24/04/2019	Alta
1197	6 meses	M	Belo Horizonte	08/07/2019	09/07/2019	Alta
1200	14 anos	F	Betim	28/05/2019	03/07/2019	Alta
1202	9 anos	F	Belo Horizonte	30/06/2019	05/07/2019	Alta
1212	7 anos	M	Porteirinha	05/07/2019	10/07/2019	Alta
1234	2 anos	M	Belo Horizonte	28/06/2019	01/07/2019	Alta

F = feminino, M = masculino, SD = sem dados.

A maioria das crianças infectadas com DENV-3 são do sexo masculino, possuem até 5 anos de idade. A maioria das amostras analisadas são do ano de 2019. Todas as crianças receberam alta e uma não tivemos acesso ao prontuário (595) (Tabela 12).

**Tabela 13:** Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV-4.

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Início dos sintomas</b>	<b>Coleta LCR</b>	<b>Desfecho clínico</b>
841	2 anos	F	Brumadinho	15/11/2019	20/11/2019	Alta
1140	5 meses	F	Belo Horizonte	24/02/2019	26/04/2019	Alta
1166	2 anos	M	Iguatama	28/02/2019	20/03/2019	Alta
1175	10 meses	F	Conceição do Pará	27/02/2019	09/03/2019	Alta

F = feminino, M = masculino, SD = sem dados.

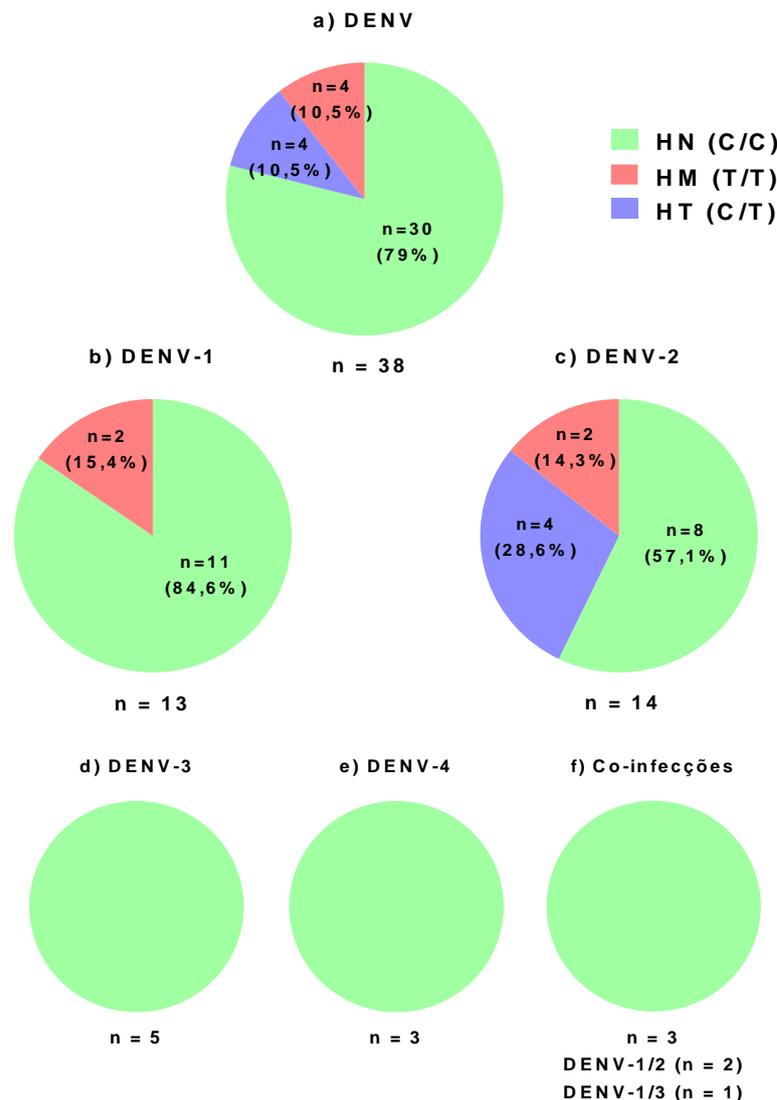
A maioria das crianças infectadas com DENV-4 são do sexo feminino e não moram em Belo Horizonte. Todas as amostras são do ano de 2019 e receberam alta (Tabela 13).

**Tabela 14:** Dados de crianças com manifestações de SNC infectadas com coinfeções de diferentes sorotipos de DENV.

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Início dos sintomas</b>	<b>Coleta LCR</b>	<b>Desfecho clínico</b>
1002	1 ano	M	Santa Luzia	07/08/2018	10/08/2018	Alta
1098	8 meses	M	Santa Luzia	08/07/2018	23/07/2018	Alta
1188	1 mês	M	Corinto	01/11/2018	02/12/2018	Alta
437	10 anos	F	Belo Horizonte	28/03/2014	03/04/2014	Alta
1133	10 meses	F	Nova Lima	13/02/2019	16/02/2019	Alta
571	9 anos	F	Betim	23/03/2015	26/03/2015	Alta
557	9 anos	F	SD	25/11/2014	01/12/2014	Alta
615	5 anos	M	Ribeirão das Neves	29/10/2015	01/11/2015	Alta

F = feminino, M = masculino, SD = sem dados.

A maioria das crianças com coinfeção não moram em Belo Horizonte. A maioria das amostras são dos anos de 2018 e 2019. Todas as crianças receberam alta (Tabela 14).



**Figura 32: Detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* em crianças com manifestações de SNC e infectadas com DENV.** O DNA extraído do LCR de crianças com manifestações de SNC e infectadas com DENV (n = 38) foi amplificado e sequenciado com iniciadores específicos para a detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap*. As análises foram feitas nos softwares Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) e novoSNP (Department of Molecular Genetics - VIB and University of Antwerp). As amostras estão apresentadas em número total de crianças infectadas com DENV **a)** DENV (n = 38) ou divididas por sorotipo e coinfeção **b)** DENV-1 (n = 13), **c)** DENV-2 (n = 14), **d)** DENV-3 (n = 5), **e)** DENV-4 (n = 3), **f)** Coinfeções DENV-1/2 (n = 2) e DENV-1/3 (n = 1). HN = Homozigoto normal, HM = Homozigoto Mutado, HT = Heterozigoto.

A base mutada T não foi detectada em 30 das 38 amostras analisadas, sendo consideradas HN para o SNP *tirap* (Figura 32a). Foram detectadas quatro amostras HM (Figura 32a), duas amostras são de crianças infectadas com DENV-1 e duas são de crianças infectadas com DENV-2 (Figuras 32b e 32c). Foram detectadas 4 amostras HT (Figura 32a), que são de crianças infectadas com DENV-2 (Figura 32b).

As crianças infectadas com DENV-3, DENV-4 ou coinfectadas foram HN (Figura 32d, 32e, 32f).

Para comparar os dados obtidos nas amostras de pacientes positivos para DENV com o que é observado na população global, foi feito o cálculo da frequência dos alelos C (normal) e T (mutado) encontrados no estudo. As frequências encontradas e as frequências observadas na população global e americana estão apresentadas na tabela 7.

**Tabela 15:** Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes positivos para DENV versus frequências do dbSNP.

SNP	Frequências	Alelo	
		C (normal)	T (mutado)
TIRAP	Global ALFA	0.85	0.15
	Global 1000genomes	0.91	0.09
	Global gnomAD	0.89	0.11
	Americana 1000genomes	0.91	0.09
	Americana gnomAD	0.90	0.10
	DENV	0.84	0.16
	DENV-1	0.85	0.15
	DENV-2	0.71	0.29

Fonte: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

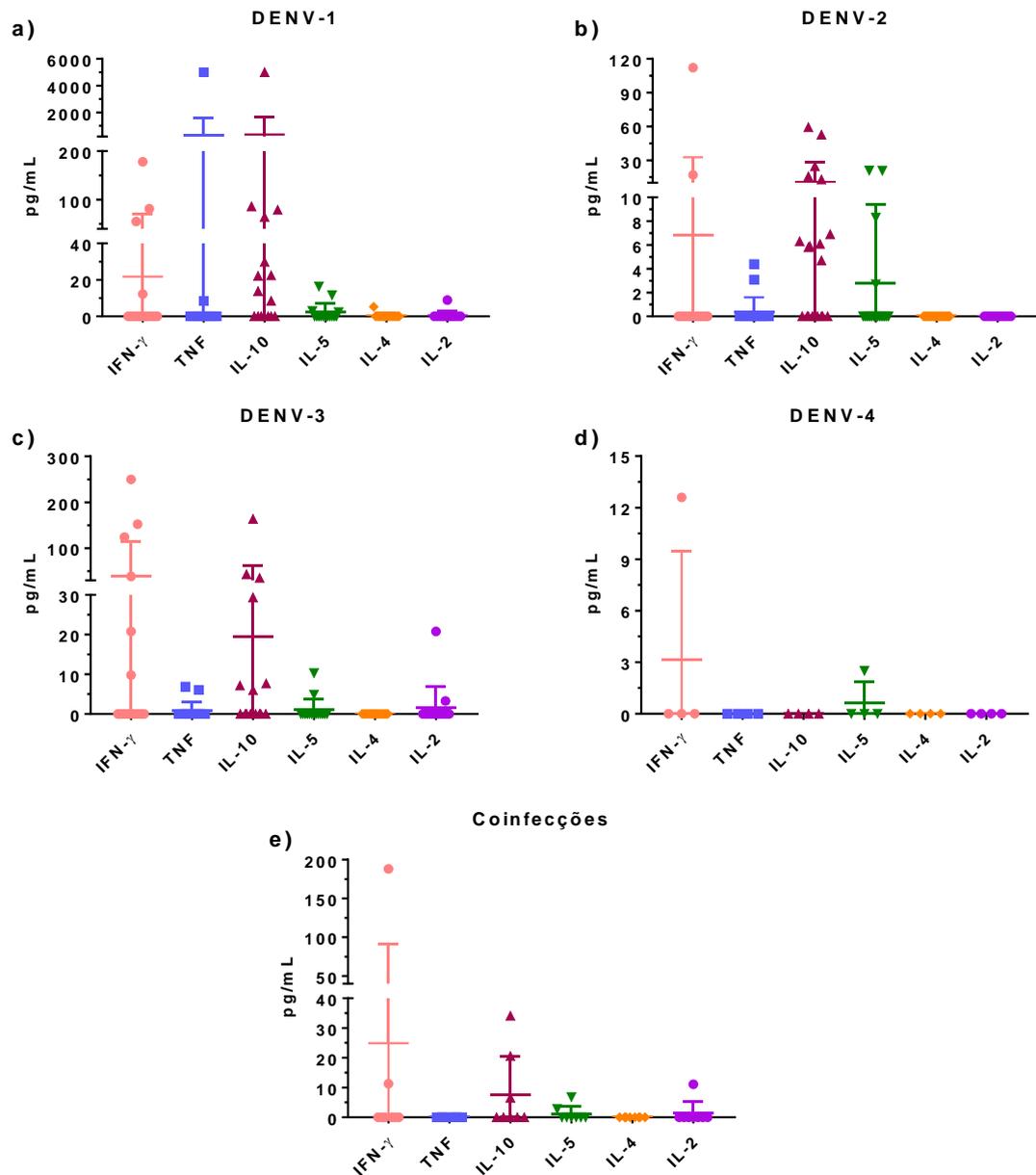
As frequências dos alelos encontradas nas amostras positivas para DENV, sem distinção do sorotipo, são semelhantes às frequências observadas nas populações globais e americanas dos diferentes estudos (Tabela 15). Quando separamos as amostras por sorotipo, o mesmo ocorre nas amostras positivas para DENV-1, já nas amostras positivas para DENV-2, a frequência do alelo T (mutado) é maior em relação às frequências globais e americanas dos diferentes estudos (Tabela 15).

Este mesmo SNP rs8177374 no gene *tirap* já foi analisado por ALAGARASU e colaboradores (2015), que também detectaram frequência significativamente maior para HT e HM em pacientes com dengue hemorrágica, sem distinção de sorotipo, quando comparadas às frequências destes genótipos nos pacientes controles saudáveis. ALAGARASU e colaboradores (2015), também analisaram SNPs nos genes *tlr3*, *tlr7* e *tlr8*. Para o SNP rs3775291 no gene *tlr3*, detectaram frequência do genótipo HT significativamente menor nos pacientes com dengue hemorrágica em

comparação com febre da dengue e pacientes controles saudáveis, este SNP não foi analisado neste trabalho. O SNP rs179008 no gene *tlr7* foi observado em uma frequência muito menor na população do estudo. Para os SNPs rs3764879 e rs3764880 no gene *tlr8*, foi sugerida uma associação com febre da dengue e dengue hemorrágica, em pacientes do sexo masculino (ALAGARASU *et al.*, 2015). SNPs no gene de *tnf- $\alpha$*  foram associados a manifestações graves da dengue (FERNANDEZ-MESTRE *et al.*, 2004; PEREZ *et al.*, 2010; GARCÍA-TREJO *et al.*, 2011).

Os estudos de Fernandez-Mestre e colaboradores (2004), PEREZ e colaboradores (2010), García-Trejo e colaboradores (2011) e ALAGARASU e colaboradores (2015) citados, juntamente com a análise realizada neste trabalho, demonstram a importância da associação entre polimorfismos e infecção pelo vírus DENV. Porém, estudos que relacionam SNPs em genes da imunidade inata e dengue ainda são escassos, o que evidencia a necessidade de mais estudos nesta área.

Para a quantificação de citocinas, as amostras de DENV estão apresentadas separadas por sorotipo e coinfeção, sendo 15 amostras de DENV-1, 19 amostras de DENV-2, 15 amostras de DENV-3, quatro amostras de DENV-4, três amostras de coinfeção DENV-1/2, duas amostras de coinfeção DENV1/3, uma amostra de coinfeção DENV-2/3 e duas amostras de tripla coinfeção DENV-1/2/3. As amostras de coinfeção estão apresentadas juntas na figura 31e.



**Figura 33: Detecção de citocinas no LCR de crianças com manifestações de SNC infectadas com DENV.** LCR positivo para DENV (n = 61) de crianças internadas com manifestações de SNC no HIJPII/FEHMIG foi analisado por citometria de fluxo com o kit Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences) para quantificação de citocinas. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite de detecção não foram apresentadas na figura. a) DENV-1 (n = 15), b) DENV-2 (n = 19), c) DENV-3 (n = 15), d) DENV-4 (n = 4), e) Coinfecções: DENV-1/2 (n = 3), DENV-1/3 (n = 2), DENV-2/3 (n = 1), DENV-1/2/3 (n = 2).

De maneira geral, a citocina mais detectada foi IL-10, que só não foi detectada nas amostras positivas para DENV-4 (Figura 33). IFN- $\gamma$  foi a segunda citocina mais detectada, seguido de IL-5 (Figura 33). TNF e IL-10 foram as citocinas com maior quantificação, sendo quantificado 5000 pg/mL na amostra 1049, positiva para DENV-1 (Figura 33a e Tabela 16). Nesta amostra ocorreu a única detecção de IL-4 (Figura 33a e Tabela 16) entre todas as amostras positivas para DENV (Figura 33).

LI e colaboradores (2017), analisaram o LCR de 29 crianças infectadas com DENV e detectaram aumento de IL-6, IL-8 e MCP-1, que não foram analisadas neste trabalho. MEHTA e colaboradores (2017) também analisaram os níveis de IL-6 e IL-8 no LCR e no soro de pacientes infectados com DENV com manifestações neurológicas e detectaram aumento significativo nos níveis de IL-6 no soro e no LCR e de IL-8 no soro nos pacientes infectados com sintomas de SNC e periférico em comparação com os controles. Já os níveis de IL-8 no LCR foram significativamente maiores apenas nos pacientes com sintomas de SNC (MEHTA *et al.*, 2017). E ainda, os níveis de IL-6 no soro e de IL-6 e IL-8 no LCR foram significativamente maiores em pacientes com sintomas de SNC com resultados negativos quando comparados aos pacientes com resultados positivos (MEHTA *et al.*, 2017).

NGWE TUN e colaboradores (2020) detectaram aumento de IFN- $\gamma$  no soro de pacientes com dengue grave, quando comparados aos pacientes com dengue com e sem sinais de alarme. Neste trabalho foram analisadas crianças com manifestações de SNC, um dos possíveis órgãos comprometidos na dengue grave, com detecção de RNA de DENV no LCR e IFN- $\gamma$  foi a segunda citocina mais detectada no LCR destas crianças (Figura 33). NGWE TUN e colaboradores (2020) também detectaram altos níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes com dengue com sinais de alarme e dengue grave, quando comparados aos pacientes controle saudáveis. Neste trabalho, em LCR, TNF foi detectado em poucas amostras, mas foi a citocina com maior quantificação, junto com IL-10, que foi a citocina mais detectada (Figura 33). NGWE TUN e colaboradores (2020), também detectaram altos níveis de IL-10 no soro de pacientes com dengue grave, quando comparado aos pacientes com dengue com e sem sinais de alarme.

Os resultados da quantificação de citocinas no LCR e a detecção de polimorfismos estão apresentados em conjunto na tabela 8 (DENV-1), 10 (DENV-2), 12 (DENV-3), 14 (DENV-4) e 16 (coinfecções de DENV).

Os dados citoquímicos dos LCRs estão apresentados na tabela 9 (DENV-1), 11 (DENV-2), 13 (DENV-3), 15 (DENV-4) e 17 (coinfecções de DENV).

**Tabela 16:** Detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com **DENV-1**.

Amostra	SNP	Citocinas (pg/mL)					
	TIRAP	IFN- $\gamma$	TNF	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
100	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
661	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
843	HN	ND	ND	<b>86,1</b>	ND	ND	ND
1015	HN	ND	ND	<b>13,8</b>	ND	ND	ND
1018	HN	<b>81,3</b>	<b>8,4</b>	<b>64,4</b>	ND	ND	ND
1043	HN	ND	ND	<b>79,0</b>	2,4	ND	ND
1049	HN	<b>178,2</b>	<b>5000</b>	<b>5000</b>	<b>16,4</b>	<b>5,3</b>	<b>8,9</b>
1076	HN	<b>55,3</b>	ND	<b>22,2</b>	<b>11,7</b>	ND	ND
1099	HN	ND	ND	<b>22,5</b>	ND	ND	ND
1105	HN	ND	ND	<b>29,8</b>	ND	ND	ND
1116	<b>HM</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1129	HN	<b>12,2</b>	ND	<b>8,5</b>	<b>3,0</b>	ND	ND
1164	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1170	<b>HM</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1193	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = não detectado, HN = Homozigoto normal, HM = Homozigoto mutado, NF = não feito.

**Tabela 17:** Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para **DENV-1**.

Amostra	Citologia					Exames Bioquímicos		
	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Outros (%)	Glicose (mg/dL)	Proteína (mg/dL)	Lactato (mmol/L)
Valores de referência	0 - 5	70 - 100	30%	-	-	40 - 70	12 - 60	0,6 - 2,2
100	2	76	-	-	-	<b>88</b>	60	1,3
661	1	99	-	-	-	55	16	-
843	<b>39</b>	63	19	2	16	63	47	1,4
1015	<b>10</b>	15	13	72	0	43	30	1,1
1018	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
1043	<b>305</b>	60	20	18	-	54	<b>80</b>	1,5
1049	<b>690</b>	6	6	80	8	<b>242</b>	<b>710</b>	<b>18,5</b>
1076	<b>113</b>	60	11	29	0	48	44	1,5
1099	<b>29</b>	28	12	60	0	37	65	2,3
1105	<b>46</b>	92	5	2	1 (MO)	39	16	1,2
1116	2	55	20	14	1 (EO) 10 (MO)	42	52	1,1
1129	<b>16</b>	93	3	4	0	57	25	1
1164	1	2	0	98	0	44	23	1,6
1170	1	100	0	0	0	46	10	1,1
1193	<b>41</b>	78	18	2	2 (MO)	50	<b>104</b>	1,3

SD = sem dados, MO = macrófago, EO = eosinófilo

Nas tabelas 16 e 17 estão apresentadas as amostras de crianças infectadas com DENV-1. De maneira geral, os LCRs em que foram detectadas citocinas apresentaram maior celularidade, com exceção da amostra 1193, que apresentou celularidade aumentada, mas não houve detecção de citocinas (Tabelas 16 e 17). Citocinas são produzidas por célula do sistema imune, a presença de linfócitos no LCR pode ser relacionada à detecção de citocinas.

Nenhuma citocina foi detectada nas amostras HM 1116 e 1170 (Tabela 16) e o LCR destas crianças não estava alterado, com exceção da proporção das células no LCR da amostra 1116, que apresentou menor porcentagem de linfócitos e maior porcentagem de neutrófilos (Tabela 17).

Na amostra HN 1049, foram detectadas todas as citocinas avaliadas, com altas concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- $\gamma$  e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Tabela 16). Pelo prontuário médico, é uma amostra de criança que veio a óbito por septicemia não especificada. A criança chegou grave ao HIPJII, ficou internada por um dia e as hipóteses diagnósticas para a causa do óbito foram gastroenterite aguda, meningite bacteriana ou meningococemia. O LCR *post-mortem* estava alterado, com celularidade e proteínas muito aumentadas, glicose e ácido láctico com valores altos também (Tabela 19), o que pode ser relacionado à detecção das citocinas.

Nas tabelas 18 e 19 estão apresentadas as amostras de crianças infectadas com DENV-2.

**Tabela 18:** Detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com **DENV-2**.

Amostra	SNP	Citocinas (pg/mL)					
	TIRAP	IFN- $\gamma$	TNF	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
575	NF	112,2	3,1	4,7	20,9	ND	ND
577	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
579	NF	17,1	4,4	24,7	ND	ND	ND
606	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
806	NF	ND	ND	13,0	ND	ND	ND
839	HM	ND	ND	15,8	2,7	ND	ND
848	HN	ND	ND	52,8	20,7	ND	ND
1009	HN	ND	ND	6,9	8,3	ND	ND
1033	HT	ND	ND	5,9	ND	ND	ND
1034	HT	ND	ND	6,3	ND	ND	ND
1058	HN	ND	ND	6,1	ND	ND	ND
1066	HN	ND	ND	5,8	ND	ND	ND
1067	HN	ND	ND	59,4	ND	ND	ND
1103	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1123	HM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1159	HT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1192	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1199	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1207	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = não detectado, HN = Homozigoto normal, HT = Heterozigoto, HM = Homozigoto mutado, NF= não feito, SD = sem dados.

**Tabela 19:** Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para **DENV-2**.

Amostra	Citologia					Exames Bioquímicos		
	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Outros (%)	Glicose (mg/dL)	Proteína (mg/dL)	Lactato (mmol/L)
Valores de referência	0 - 5	70 - 100	30%	-	-	40 - 70	12 - 60	0,6 - 2,2
575	<b>176</b>	98	0	1	1 (EO)	65	<b>97</b>	2,8
577	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
579	<b>206</b>	<b>48</b>	20	10	22 (MO)	<b>36</b>	<b>127</b>	1,5
606	5	95	0	2	3 (MO)	45	34	1,2
806	1	86	10	2	2 (MO)	60	14	1,1
839	5	78	14	4	4 (MO)	56	22	1
848	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
1009	2	85	14	1	0	62	46	1,7
1033	3	0	0	0	0	49	21	1,2
1034	6	<b>28</b>	<b>44</b>	<b>28</b>	0	67	53	1,2
1058	<b>10</b>	90	10	0	0	71	19	-
1066	1	<b>50</b>	<b>50</b>	0	0	51	18	1,2
1067	<b>890</b>	79	14	5	2 (MO)	26	<b>181</b>	3,8
1103	3	75	13	-	-	44	<b>237</b>	1,7
1123	4	76	10	14	0	45	21	1
1159	<b>18</b>	<b>39</b>	4	<b>57</b>	0	64	29	1,2
1192	1	86	10	2	2 (MO)	57	15	1
1199	<b>16</b>	<b>58</b>	14	22	-	57	56	1,2
1207	1	68	32	0	0	57	59	4,3

SD = sem dados, MO = macrófago, EO = eosinófilo.

Na amostra HM 839 foram detectadas IL-10 e IL-5 em baixa concentração, já na amostra HM 1123 não houve detecção de nenhuma citocina avaliada (Tabela 18), o LCR destas amostras não apresentou nenhuma alteração (Tabela 19). Nas amostras HT 1033 e 1034, somente IL-10 foi detectada em baixa concentração, enquanto nas amostras HT 1103 e 1159, não houve detecção de nenhuma citocina avaliada (Tabela 18). Somente a amostra HT 1159 teve alteração no LCR, a celularidade estava aumentada com predominância de neutrófilos (Tabela 19). Nas amostras 575 e 579 foram detectadas o maior número de citocinas (Tabela 18) e os LCRs destas crianças estavam com a celularidade aumentada (Tabela 19). A presença do SNP no gene *tirap* não foi avaliada nestas amostras.

**Tabela 20:** Detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com **DENV-3**.

Amostra	SNP	Citocinas (pg/mL)					
	TIRAP	IFN- $\gamma$	TNF	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
544	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
572	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
584	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
595	NF	<b>9,8</b>	<b>6,9</b>	ND	ND	ND	ND
609	NF	<b>38,4</b>	<b>6,1</b>	<b>43,4</b>	<b>10,3</b>	ND	<b>20,8</b>
620	NF	<b>250,0</b>	ND	<b>7,2</b>	<b>4,9</b>	ND	ND
633	NF	<b>124,3</b>	ND	<b>7,7</b>	ND	ND	ND
1048	NF	ND	ND	<b>6,0</b>	ND	ND	ND
1125	HN	<b>20,8</b>	ND	<b>29,4</b>	ND	ND	<b>3,3</b>
1152	HN	ND	ND	<b>35,4</b>	ND	ND	ND
1197	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1200	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1202	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1212	HN	<b>152,3</b>	ND	<b>163,9</b>	ND	ND	ND
1234	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = não detectado, HN = Homozigoto normal, NF = não feito, SD = sem dados.

**Tabela 21:** Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para **DENV-3**.

Amostra	Citologia					Exames Bioquímicos		
	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Outros (%)	Glicose (mg/dL)	Proteína (mg/dL)	Lactato (mmol/L)
Valores de referência	0 - 5	70 - 100	30%	-	-	40 - 70	12 - 60	0,6 - 2,2
544	<b>11</b>	95	5	0	0	44	17	1,5
572	2	87	9	4	0	54	11	0,9
584	5	<b>47</b>	<b>3</b>	<b>48</b>	2 (EO)	51	<b>81</b>	2,2
595	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
609	<b>1640</b>	2	0	82	1 (EO) 15 (MO)	52	<b>101</b>	4
620	<b>144</b>	62	19	18	-	64	<b>137</b>	1,5
633	<b>175</b>	<b>26</b>	<b>67</b>	5	2 (MO)	42	<b>114</b>	1,7
1048	2	100	0	0	0	49	28	1
1125	6	90	0	10	0	74	11	1,8
1152	<b>83</b>	94	5	1	0	50	28	1,2
1197	3	87	12	0	-	52	21	1
1200	2	92	0	0	0	<b>86</b>	34	1,2
1202	4	<b>30</b>	<b>5</b>	<b>62</b>	3 (EO)	43	33	1,4
1212	<b>640</b>	74	24	1	1 (MO)	37	<b>98</b>	<b>3,1</b>
1234	<b>125</b>	75	10	13	2 (MO)	64	54	1,8

SD = sem dados, MO = macrófago, EO = eosinófilo.

Nas tabelas 20 e 21 estão apresentadas as amostras de crianças infectadas com DENV-3. A presença do SNP TIRAP foi avaliada em 5 amostras e todas foram HN, houve detecção de citocinas nas amostras 1125, 1152, e 1212 (Tabela 20).

As amostras 1152 e 1212 apresentaram celularidade aumentada no LCR, principalmente a 1212 que apresentou 100 vezes mais células que o limite estabelecido pelo HIJPII e os dados de proteína e lactato também estavam altos (Tabela 21). Na amostra 609 foram detectadas o maior número de citocinas (Tabela 20) e o LCR estava alterado, com celularidade mais de 300 vezes maior que o valor de referência do HIJPII, com predominância de neutrófilos e macrófagos, com os valores de proteína e lactato altos (Tabela 21). Esta amostra foi diagnosticada com meningite bacteriana, apesar de não apresentar crescimento bacteriano na cultura do LCR e de não serem visualizadas bactérias no Gram.

**Tabela 22:** Detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* e quantificação de citocinas no LCR de crianças infectadas com **DENV-4**.

Amostra	SNP	Citocinas (pg/mL)					
	TIRAP	IFN- $\gamma$	TNF	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
841	HN	<b>12,6</b>	ND	ND	<b>2,5</b>	ND	ND
1140	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1166	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1175	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = não detectado, HN = Homozigoto normal, NF = não feito.

**Tabela 23:** Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC positivo para **DENV-4**.

Amostra	Citologia					Exames Bioquímicos		
	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Outros (%)	Glicose (mg/dL)	Proteína (mg/dL)	Lactato (mmol/L)
Valores de referência	0 - 5	70 - 100	30%	-	-	40 - 70	12 - 60	0,6 - 2,2
841	<b>126</b>	82	10	6	2 (MO)	50	<b>77</b>	1,9
1140	5	<b>37</b>	<b>13</b>	<b>49</b>	1 (EO)	54	20	1,3
1166	1	95	1	4	0	68	25	1,5
1175	8	72	28	0	0	44	10	1,2

MO = macrófago, EO = eosinófilo.

Nas tabelas 22 e 23 estão apresentadas as amostras de crianças infectadas com DENV-4. As amostras 841, 1140 e 1175 foram HN, sendo que somente a amostra 841 apresentou o LCR alterado, com celularidade aumentada (Tabela 23), e com detecção de citocinas (Tabela 22).

**Tabela 24:** Detecção do SNP rs8177374 no gene *tirap* e quantificação de citocinas no LCR de crianças com **coinfecção com diferentes sorotipos de DENV**.

Amostra	Vírus	SNP TIRAP	Citocinas (pg/mL)					
			IFN- $\gamma$	TNF	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
1002	DENV-1/2	HN	<b>188,2</b>	ND	<b>34,1</b>	<b>6,8</b>	ND	<b>11,1</b>
1098	DENV-1/2	HN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1188	DENV-1/2	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
437	DENV-1/3	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1133	DENV-1/3	HN	ND	ND	ND	<b>2,8</b>	ND	ND
571	DENV-2/3	NF	<b>11,3</b>	ND	<b>20,6</b>	ND	ND	ND
557	DENV-1/2/3	NF	ND	ND	ND	ND	ND	ND
615	DENV-1/2/3	NF	ND	ND	<b>6,6</b>	ND	ND	ND

ND = não detectado, HN = Homozigoto normal, NF = não feito.

**Tabela 25:** Dados citoquímicos do LCR de crianças com manifestações de SNC com **coinfecção com diferentes sorotipos de DENV**.

Amostr a	Vírus	Citologia					Exames Bioquímicos		
		Leucócito s (/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Outros (%)	Glicose (mg/dL)	Proteína (mg/dL)	Lactat (mmol/
Valores de referência		0 - 5	70 - 100	30%	-	-	40 - 70	12 - 60	0,6 - 2
1002	DENV-1/2	<b>20</b>	81	6	9	4 (MO)	47	58	1,2
1098	DENV-1/2	1	100	0	0	0	51	21	1,4
1188	DENV-1/2	1	80	14	2	-	62	<b>102</b>	0,8
437	DENV-1/3	<b>8</b>	64	16	8	2 (EO) 10 (MO)	52	13	1,2
1133	DENV-1/3	<b>10</b>	77	12	6	5 (MO)	74	15	1,2
571	DENV-2/3	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>86</b>	0	63	24	2,1
557	DENV-1/2/3	<b>28</b>	71	0	29	0	70	30	1,4
615	DENV-1/2/3	<b>70</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	0	38	22	1,7

MO = macrófago, EO = eosinófilo.

Nas tabelas 24 e 25 estão apresentadas as amostras com coinfeções de diferentes sorotipos de DENV. Foi realizada a análise do SNP TIRAP em três amostras e todas foram HN (Tabela 24). De modo geral, as amostras que apresentaram maior celularidade no LCR foram as amostras em que foram detectadas citocinas, com exceção da amostra 557, que apresentou celularidade aumentada, mas não foram detectadas citocinas (Tabelas 24 e 25).

As amostras de DENV analisadas foram coletadas entre 2014 e 2019. Segundo a Secretaria de Saúde de Minas Gerais, os quatro sorotipos de DENV são identificados no Estado de Minas Gerais desde 2011, com predomínio de DENV1 até 2017 e, a partir de 2018, DENV2 predomina dentre as amostras testadas, sendo o sorotipo mais detectado no ano de 2019. Foram analisadas muitas amostras de DENV-2 provenientes dos anos 2018 e 2019, mas também foram analisadas muitas amostras de DENV-1 e DENV-3. E as quatro amostras de DENV-4 também foram provenientes deste ano.

### 5.3. Análise comparativa das frequências observadas em pacientes infectados com flavivírus com o banco de dados dbSNP

Para comparar as frequências dos alelos encontradas nos pacientes infectados com flavivírus de maneira geral com as frequências observadas nas populações globais e americanas, os dados obtidos nas análises de SNP de pacientes infectados com DENV e ZIKV foram agrupados e estão apresentados na tabela 26. Como somente o SNP TIRAP foi analisado para todas as amostras, somente este SNP está apresentado na tabela.

**Tabela 26:** Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes infectados com flavivírus versus frequências do dbSNP.

SNP	Frequências	Alelo	
		C (normal)	T (mutado)
TIRAP	Global ALFA	0.85	0.15
	Global 1000genomes	0.91	0.09
	Global gnomAD	0.89	0.11
	Americana 1000genomes	0.91	0.09
	Americana gnomAD	0.90	0.10
	Flavivírus	0.82	0.18

Fonte: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Quando comparado com a frequência global dos alelos no estudo ALFA, a frequência observada nos pacientes positivos para flavivírus é semelhante. Quando comparado com as frequências globais e americanas dos estudos 1000genomes e gnomAD, a frequência do alelo T (mutado) observada é maior (Tabela 26).

## 5.4. Infecção e imunidade inata em crianças: SARS-CoV-2

### 5.4.1. Análise de SNP em crianças infectadas com SARS-CoV-2

Em 2019 foi descrita a emergência do SARS-CoV-2. Este foi disseminado mundialmente causando uma pandemia com mais de 500 milhões de infectados e mais de 6 milhões de óbitos (WHO, 2022). Estudos demonstraram, até a realização deste trabalho, em junho de 2021, antes da variante ômicron surgir, que crianças são menos afetadas pela infecção que adultos (SOLA *et al.*, 2021; DONG *et al.*, 2020; LUDVIGSSON, 2020) mas crianças pequenas, principalmente bebês, são vulneráveis à infecção (DONG *et al.*, 2020). Embora a porcentagem de crianças infectadas com SARS-CoV-2 seja menor e a doença grave e morte sejam menos frequentes, já foi relatado que crianças apresentaram SIMP, doença de Kawasaki, síndrome do choque tóxico, sepse viral e hepatite (VINER; WHITTAKER, 2020; HARWOOD *et al.*, 2021; RIPHAGEN *et al.*, 2020; VARUN, 2021; WHITTAKER *et al.*, 2020). Estudos que avaliam uma associação entre fatores de risco e a gravidade da doença em crianças ainda são escassos (DONG, Y. *et al.*, 2020).

Para avaliar o papel de alguns genes da imunidade inata na infecção por SARS-CoV-2, o DNA de crianças com quadro grave de Covid-19 foi analisado para detecção de SNPs em genes relacionados à resposta imune inata. Foram selecionadas crianças com Covid-19 hospitalizadas com teste sorológico ou PCR positivos, sendo apenas uma criança selecionada por critério epidemiológico. Foram analisados os mesmos SNPs anteriormente descritos.



**Figura 34: Detecção de SNP em genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *myd88*, *oas3* e *mcp-1* de crianças infectadas com SARS-CoV-2.** O DNA extraído do sangue de crianças infectadas com SARS-CoV-2 foi amplificado e sequenciado com iniciadores específicos para a detecção de SNPs nos genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *myd88*, *oas3* e *mcp-1*. As análises foram feitas nos softwares Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) e novoSNP (Department of Molecular Genetics - VIB and University of Antwerp). **a)** TLR3a: SNP rs3775291 no gene *tlr3* (C>T) (n= 59), **b)** TLR3b: SNP rs5743316 no gene *tlr3* (A>T) (n = 59), **c)** TLR7: SNP rs179008 no gene *tlr7* (A>T) (n = 59), **d)** TIRAP: SNP rs8177374 no gene *tirap* (C>T) (n = 59), **e)** MyD88: SNP rs387907272 no gene *myd88* (T>C) (n = 42), **f)** OAS3: SNP rs61942233 no gene *oas3* (C>T) (n = 53), **g)** MCP-1: SNP rs1024611 no gene *mcp-1* (A>G) (n = 59). HN = Homozigoto normal, HT = Heterozigoto. HM = Homozigoto mutado.

Foram analisadas 59 amostras para os SNPs TLR3 a e b, TLR-7, TIRAP e MCP-1. Destas, uma amostra foi HM e 18 amostras foram HT para TLR-3a (Figura 34a), todas foram HN para TLR3b (Figura 34b), nove amostras foram HM e sete amostras foram HT para TLR-7 (Figura 34c), 16 amostras foram HT para TIRAP (Figura 34d) e nove amostras foram HM e 23 amostras foram HT para MCP-1 (Figura 34g). Para o SNP MyD88 foram analisadas 42 amostras e OAS3 foram analisadas 53 amostras e não foram observadas bases mutadas, sendo todas as amostras HN (Figuras 34b, 34e e 34f).

Para comparar as frequências dos SNPs avaliados com as frequências encontradas na população global, foi feito o cálculo da frequência de cada alelo normal ou mutado de cada SNP. Os resultados estão apresentados na tabela 27, junto com as frequências globais obtidas do banco de dados dbSNP.

**Tabela 27:** Análise comparativa entre as frequências dos alelos obtidas nas amostras de pacientes com Covid-19 grave versus frequências do dbSNP.

SNP	Frequências	Alelo	
		Normal	Mutado
TLR3a	Global ALFA	C = 0.72	T = 0.28
	Global 1000genomes	C = 0.77	T = 0.23
	Global gnomAD	C = 0.76	T = 0.24
	Americana 1000genomes	C = 0.695	T = 0.305
	Americana gnomAD	C = 0.71	T = 0.29
	Covid-19	C = 0.83	T = 0.17
TLR3b	Global ALFA	A = 0.99992	T = 0.00008
	Global 1000genomes	SD	SD
	Global gnomAD	A = 0.999964	T = 0.000036
	Americana 1000genomes	SD	SD
	Americana gnomAD	A = 1	T = 0
	Covid-19	A = 1	T = 0
TLR7	Global ALFA	A = 0.80	T = 0.20
	Global 1000genomes	A = 0.88	T = 0.12
	Global gnomAD	A = 0.81	T = 0.19
	Americana 1000genomes	A = 0.79	T = 0.21
	Americana gnomAD	A = 0.79	T = 0.21
	Covid-19	A = 0.79	T = 0.21
TIRAP	Global ALFA	C = 0.85	T = 0.15
	Global 1000genomes	C = 0.91	T = 0.09
	Global gnomAD	C = 0.89	T = 0.11
	Americana 1000genomes	C = 0.91	T = 0.09
	Americana gnomAD	C = 0.90	T = 0.10
	Covid-19	C = 0.86	T = 0.14
MyD88	Global ALFA	T = 0.99981	C = 0.00019
	Global 1000genomes	T = 0.9998	C = 0.0002
	Global gnomAD	T = 0.999993	C = 0.000007
	Americana 1000genomes	T = 1	C = 0
	Americana gnomAD	T = 0.99993	C = 0.00007
	Covid-19	T = 1	C = 0
OAS3	Global ALFA	C = 0.985	T = 0.015
	Global 1000genomes	C = 0.995	T = 0.005
	Global gnomAD	C = 0.99	T = 0.01
	Americana 1000genomes	C = 0.994	T = 0.006
	Americana gnomAD	C = 1	T = 0
	Covid-19	C = 1	T = 0.0
MCP-1	Global ALFA	A = 0.72	G = 0.28
	Global 1000genomes	A = 0.64	G = 0.36
	Global gnomAD	A = 0.72	G = 0.28
	Americana 1000genomes	A = 0.51	G = 0.49
	Americana gnomAD	A = 0.57	G = 0.43
	Covid-19	A = 0.65	G = 0.35

Fonte: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

A frequência do alelo mutado do SNP TLR3a foi menor nos pacientes com Covid-19 em relação às frequências globais e americanas dos diferentes estudos. A frequência do alelo mutado do SNP TLR7 nos pacientes com Covid-19 foi maior em relação à frequência global do estudo 1000genomas, mas foi semelhante ou igual às frequências globais e americanas dos demais estudos. A frequência do alelo mutado do SNP TIRAP nos pacientes com Covid-19 foi semelhante à frequência global do estudo ALFA e foi maior que as frequências globais e americanas dos demais estudos. A frequência do alelo mutado do SNP MCP-1 foi maior nos pacientes com Covid-19 em relação à frequência das populações globais dos estudos ALFA e gnomAD, semelhante à frequência global do estudo 1000genomes e menor que as frequências americanas. As frequências dos alelos mutados dos SNPs TLR3b, MyD88 e OAS3 nos pacientes com Covid-19 foram iguais a 0, o que é semelhante as frequências globais e americanas, que são próximas de 0 e até mesmo igual a 0 em alguns estudos (Tabela 27).

VAN DER MADE e colaboradores (2020) identificaram variantes únicas de perda de função no gene *tlr7* no cromossomo X em quatro homens com Covid-19 grave. Deleção de quatro nucleotídeos, que provoca perda total de função do TLR7, foi identificada em dois pacientes irmãos, um deles veio a óbito. Nos outros pacientes, também irmãos, foi identificada mutação missense, que foi prevista como deletéria em todas as ferramentas de previsão *in silico*, a alteração de aminoácidos resultante afeta o domínio carboxiterminal da região de repetição rica em leucina. Embora a frequência do SNP rs179008 no gene *tlr7* obtida neste trabalho não foi diferente das frequências do banco de dados dbSNP, foram identificados sete pacientes HT e nove pacientes HM que tiveram Covid-19 grave.

PAIRO-CASTINEIRA e colaboradores (2020), analisaram o genoma de 2.244 pacientes com infecção grave por SARS-CoV-2 e identificaram associação com genes que codificam OAS1, OAS2 e OAS3 e no gene receptor de interferon IFNAR2. Neste trabalho foi analisado SNP no gene *oas3*, mas não foram identificadas mutações.

Ainda existem poucos estudos que relacionam a presença de polimorfismos em genes do sistema imune e a infecção por SARS-CoV-2, a maioria dos estudos relacionam infecções por SARS-CoV-2 e mutações nos genes da serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) e da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que

desempenham um papel crucial na penetração do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras (PANIRI; HOSSEINI; AKHAVAN-NIAKI, 2021; TAHER *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021; ASSELTA *et al.*, 2020; LOPERA MAYA *et al.*, 2020).

Os estudos citados acima evidenciam a relação entre mutações no DNA humano e a susceptibilidade à Covid-19, e a importância de investigar mutações em genes do sistema imune inato como mecanismo de prevenção à Covid-19 grave.

#### **5.4.2. Impacto de SNP nas infecções por SARS-CoV-2: estudo de casos**

Apesar de nossos estudos terem identificado uma frequência diferente do alelo mutado do SNP TLR3a, o estudo de casos identificou mais claramente o impacto dos SNPs em crianças com Covid-19.

Uma criança do sexo masculino, de 5 anos, iniciou com febre, odinofagia, diarreia, dor abdominal e vômitos em 19 de agosto de 2020. No dia 23, ainda com febre, apresentou acolia fecal e icterícia. A criança foi internada após avaliação médica e exames que detectaram hepatite. Além disso, o paciente tem asma e fez uso intensivo de spray de beclometasona na dose baixa de 100 mcg/dia. Ele não tinha outras doenças, e esta foi sua primeira internação hospitalar. No cartão de vacinação da criança constava uma dose de hepatite A e três doses de hepatite B. Após entrevista com os cuidadores da criança, também foi descartada possível ingestão acidental de medicamentos ou substâncias hepatotóxicas.

A criança permaneceu internada para tratamento de suporte e exames por 4 dias, recebendo alta com melhora da febre, vômitos e dor abdominal. No entanto, foi internada novamente 4 dias depois por apresentar febre, cansaço e edema em membros inferiores. Ele recebeu alta após três dias. Não houve sangramento ou falha hemodinâmica em nenhum momento. O paciente recebeu apenas tratamento de suporte.

Para investigar a possível causa dessa hepatite neste paciente, foram realizados testes sorológicos para hepatites virais (hepatite A, B, C, E, HIV-1 e -2, EBV e CMV) e exames para avaliar possível hepatite autoimune, doença de Wilson, e deficiência de alfa1-antitripsina (Tabela 28). Todos esses testes foram negativos. O paciente apresenta IgG positivo para EBV e CMV. Como o paciente apresentava uma

epidemiologia positiva para Covid-19 associada a febre, odinofagia e alterações nos marcadores inflamatórios, perfil de coagulação e D-dímero, foi solicitado teste sorológico que deu positivo para IgM, IgG e IgA para SARS-CoV- 2, com os kits Biolisa-CoV-2 IgM, Biolisa-CoV-2 IgG e Biolisa-CoV2 IgA (Bioclin, Quibasa, Brasil), respectivamente. O RT-qPCR para SARS-CoV-2 foi realizado na nasofaringe e orofaringe seis dias após os sintomas e foi negativo (Tabela 28).

Foi feito um ecocardiograma devido à possibilidade de síndrome inflamatória multissistêmica associada à Covid-19, mas o exame não evidenciou alterações na função cardíaca ou dilatação coronariana. Após a alta hospitalar, o paciente continua em acompanhamento ambulatorial com equipe de gastroenterologia pediátrica, porém, sem outras manifestações clínicas. O paciente foi submetido a exame de colangiorressonância em janeiro de 2021, mas o exame não apresentou alterações. Neste momento, o anticorpo antinuclear também não foi reativo. Outros exames diagnósticos realizados para diagnósticos diferenciais como doença de Wilson, deficiência de alfa-1-antitripsina, hepatite autoimune e colangite esclerosante primária foram negativos. O paciente posteriormente foi internado mais duas vezes.

Os SNPs avaliados detectaram o SNP mutado para TLR-7. A hepatite provocada pelo SARS-CoV-2 pode estar associada ao comprometimento da imunidade inata contra o vírus causado pelo polimorfismo em *tlr-7*. O mesmo SNP foi relatado por Fakhir e colaboradores (2018) como sendo uma das causas da resposta imune prejudicada durante a infecção pelo HCV. Azar e colaboradores (2020) relataram que pacientes infectados pelo HIV-1, que apresentavam esta mutação, produziram menores quantidades de TLR-7, resultando em menor produção de IFN-1, com conseqüente maior carga viral.

**Tabela 28:** Resultados laboratoriais, testes para hepatite, testes sorológicos e SNPs.

<b>Testes (unidades)/Datas</b>	<b>24-26/08</b>	<b>02/09</b>	<b>18/11</b>	<b>Valor de referência</b>
Hemoglobina (g/dL)	12,8	10,7	12,9	11,5 - 13,5
Leucócitos (cels/mm <sup>3</sup> )	10.030	8.450	6.170	5.000-14.500
Plaquetas (cells/ mm <sup>3</sup> )	369.000	589.000	432.000	150.000 – 400.000
Proteína C-Reativa (mg/L)	<b>233</b>	62	-	< 12
Aspartato aminotransferase (IU/L)	<b>326</b>	48	33	10-47
Alanina aminotransferase (IU/L)	<b>234</b>	49	19	24-49
Bilirubina/ Bilirubina direta (mg/dL)	<b>4,4/4,0</b>	0,9/0,6	0/0	≤ 1,2/≤ 0,4
Gamma-glutamil transferase (IU/L)	<b>833</b>	239	22	< 30
Fosfatase alcalina (IU/L)	<b>770</b>	329	253	142-335
Albumina (g/dL)	3,9	3,9	4,3	2,9-4,7
Tempo de ativação parcial da protrombina (seg)	<b>69</b>	<b>62</b>	<b>77</b>	25-35
Razão normalizada internacional (RNI)	<b>1,28</b>	<b>1,38</b>	<b>1,3</b>	0,87-1,2
D-dimero (mcg/mL)	<b>1,46</b>	<b>1,83</b>	-	≤ 0,5
α1-antitripsina (mg/L)	<b>293</b>	-	-	78- 200
Ceruloplasmina (mg/dL)	36	-	-	20-60
Anticorpo antinuclear	<b>1:80</b>	-	-	NR
Anti-músculo liso	NR	-	-	NR
Cobre sérico (mcg/dL)	177	-	-	90-190
Cobre urinário (mcg/24hs)	11	-	-	≤ 60
Anti-microsomal de fígado/rim tipo I	-	NR	-	NR
SARS-CoV-2 IgG/IgA/IgM	<b>P/P/P</b>	-	-	N
VDRL	N	-	-	N
RTqPCR Influenza A, B; RSV e SARS-CoV2	N/N/N	-	-	N/N/N
Anti- HIV 1,2	N	-	-	N
Anti- hepatite A virus/C virus	N/N	-	-	N/N
Anti-hepatite E IgM	N	-	-	N
Hepatite B, HBsAg, anti- HBc-IgM	N/N	-	-	N/N
Anti- herpes virus humano IgM	N	-	-	N
Anti-citomegalovirus IgG/IgM	P/N	-	-	N
Anti-Epstein–Barr virus IgG/IgM	P/N	-	-	N
TLR-7 T/T (A/A)	-	-	<b>HM</b>	-
TLR-3 C/C (T/T)	-	-	HN	-
TIRAP C/C (T/T)	-	-	HN	-
MCP-1 A/A (G/G)	-	-	HN	-
OAS-3 C/C (T/T)	-	-	HN	-

MCP-1 = monocyte chemoattractant protein 1; OAS = 3'2'-5'-Oligoadenylate Sintetase 3; SARS-CoV-2 = Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2; SNP = Single nucleotide polymorphism; RSV = respiratory syncytial virus; TIRAP = Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein; TLR-3 = Toll like receptor 3; TLR-7 = Toll Like Receptor 7; VDRL = Venereal Disease Research Laboratory; HM = homozigoto mutado; HN = homozigoto normal; P = positivo; N = negativo; NR = não reativo; NF = não feito.

Três crianças com anemia falciforme e Covid-19 que evoluíram com complicações durante a internação ou após a alta foram investigadas. Estas crianças apresentaram complicações significativas da anemia falciforme, tais como síndrome torácica aguda, sequestro esplênico e crise de dor durante a internação ou até 2 meses após a infecção por SARS-CoV-2. Todas necessitaram de transfusão de concentrado de hemácias e internação em hospital de referência. Foram detectados

os SNPs rs179008 no gene *tlr-7* em uma criança, e rs8177374 no gene *tirap* em duas delas (PESSOA et al., 2022) (Tabela 29).

**Tabela 29:** Resultados laboratoriais, teste para SARS-CoV-2 e SNPs.

Testes (units) demográfico/pacientes	1	2	3	Valor Referência
Idade (a, m)	15	1, 5	6	-
Sexo	Feminino	Masculino	Feminino	-
Saturação oxigênio na admissão	90%	98%	80%	94-100%
Manifestação clínica	Síndrome torácica aguda	Síndrome Flu	Pneumonia viral	-
Tomografia de peito	Infiltrado intersticial difuso. Aglomerado brônquico-vascular na base do pulmão direito	NF	Infiltrado intersticial do segmento posterior e inferior do hemitórax direito. Espessamento brônquico bilateral	-
RT-qPCR SARS-CoV-2	P	P	P	N
Antígeno SARS-CoV-2	NF	NF	P	N
Hemoglobina (g/fdL)	6,3	7,7	5,5	11,5 - 13,5
Reticulócitos (%)	0,1	7,8	14,2	1 - 1,5
Leucócitos (cels x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	11,8	3,9	21,9	5 – 14,5
Neutrófilos (cels x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	7,0	1,5	16,4	1,5-8,0
Linfócitos (cels x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3,2	2,2	2,8	1,5-6,5
Plaquetas (cels/ mm <sup>3</sup> x 10 <sup>3</sup> )	418	87	195	150 – 400
Proteína C-Reactiva (mg/L)	49,6	6,0	85,9	< 12
TLR-7 T/T (A/A)	HT	HN	HN	-
TIRAP C/C (T/T)	HN	HT	HT	-

TIRAP = Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein; TLR-7 = Toll Like Receptor 7; HN = homozigoto normal; HT = heterozigoto NF = não feito, P = positivo, N = negativo.

A doença falciforme (DF) é uma expressão clínica de homozigose para a hemoglobina S (HbS) caracterizada por anemia hemolítica crônica. Em todo o mundo estima-se que 3,2 milhões de pessoas vivem com DF. Pacientes com DF podem desenvolver síndrome torácica aguda, embolia pulmonar e acidente vascular cerebral (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

O sistema imune inato é ativado na DF com alta expressão de TLR-4 (KATO et al., 2018), que depende de TIRAP para ser funcional. Há envolvimento de células imunes inatas, incluindo monócitos, neutrófilos, plaquetas e mastócitos, promovendo inflamação, adesão e dor (ALLALI et al., 2020).

A primeira paciente, uma adolescente de 15 anos, deu entrada no hospital apresentando síndrome torácica aguda iniciada uma semana após o início dos sintomas de Covid-19. Apresentava dor intensa no esterno e tórax bilateral, dependente da ventilação. Foi necessária oxigenoterapia por cânula nasal 2 L/min por oito dias e morfina para controle da dor por cinco dias. Foi medicada com antibiótico durante dez dias, com enoxaparina (40mg/dia) e salbutamol inalatório durante toda a internação. No terceiro dia de internação, qPCR para SARS-CoV-2 do swab nasofaríngeo foi positiva. No quinto dia de internação evoluiu com palidez importante associada à esplenomegalia (baço palpável a 6 cm do rebordo costal direito). O hemograma total mostrou queda da hemoglobina de 8,5 para 6,3mg/dl, sem aumento de reticulócitos (0,1%). Recebeu transfusões de hemácias, com melhora gradual, e a oxigenoterapia foi suspensa três dias depois. Recebeu alta após 11 dias de internação. O SNP rs179008 no gene *tlr-7* foi identificado neste paciente (Tabela 29).

O segundo paciente, uma criança de um ano e cinco meses, deu entrada no hospital após três dias de tosse, febre e dor de garganta. Evoluiu com diarreia e palidez, com queda da hemoglobina de 8,5 para 7,7 mg/dL. No quarto dia do início dos sintomas, RT- qPCR para SARS-CoV-2 de swab nasofaríngeo foi positivo. Ele recebeu alta após três dias. Porém, dois meses depois, foi internado na unidade de terapia intensiva de outro hospital por sequestro esplênico e recebeu transfusão sanguínea. O SNP rs8177374 no gene *tirap* foi identificado neste paciente (Tabela 29).

O terceiro paciente, uma criança de 6 anos, deu entrada no hospital um dia após o início dos sintomas, com tosse, febre e dispneia. Foi admitido no pronto-socorro por taquipneia e saturação de oxigênio de 80%, sendo administrado oxigênio por meio de máscara sem reinalação. A tomografia de tórax mostrou imagem de envolvimento intersticial no segmento posterior e inferior do tórax direito e espessamento brônquico bilateral. Foi coletado swab nasofaríngeo no primeiro dia do início dos sintomas e o RT-qPCR para o SARS-CoV-2 foi positivo. Dois dias após a alta, retornou ao hospital com crise álgica intensa associada a oligúria, diminuição da saturação de oxigênio e febre. Foi prescrita hidratação intravenosa, morfina fixa, ceftriaxona e oxigênio por cânula nasal. Três dias depois, apresentou palidez e queda da hemoglobina de 7,5 para 5,5 mg/dL. Recebeu transfusão de hemácias com

melhora progressiva, recebendo alta após uma semana com razoável controle da dor. O SNP rs8177374 no gene *tirap* foi identificado neste paciente (Tabela 29).

As crianças aqui relatadas apresentaram complicações significativas da DF como síndrome torácica aguda, sequestro esplênico e crise de dor durante a internação ou até 2 meses após a infecção por SARS-CoV-2. Todos necessitaram de transfusão de concentrado de hemácias e internação em hospital de referência para atendimento de crianças com DF. Foram analisados 37 casos de Covid-19 grave, com três pacientes com DF, correspondendo a 8,1% de todos os casos estudados.

Estes e outros estudos (STUDZIŃSKA *et al.*, 2017; DEVAL *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2021; LIAKATH *et al.*, 2021; PESSOA *et al.*, 2021; PESSOA *et al.*, 2022) indicam a relevância destas mutações no desdobramento de doenças em crianças.

## 6. CONCLUSÕES

- As amostras de ZIKV PE243 e SPH, isoladas no Brasil, foram capazes de ativar TLR2 no sistema *in vitro*, mas somente quando as células foram estimuladas com a m.o.i. 10. Esta ativação foi diferente entre as amostras brasileiras, com ZIKV PE243 ativando 12,9% a mais que ZIKV SPH, evidenciando que os vírus estimulam respostas imunes diferentes. As amostras não foram capazes de ativar TLR4 nas m.o.i. utilizadas.
- Camundongos imunocompetentes e nocautes para MyD88, TLR2/9 e NOS2 infectados com as duas amostras de ZIKV (PE243 e SPH) isoladas no Brasil sobreviveram à infecção. Porém, camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV PE243 e camundongos MyD88<sup>-/-</sup> e TLR2/9<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH apresentaram variação percentual de peso significativamente menor quando comparados aos não infectados, evidenciando a importância do sistema imune inato na infecção por ZIKV. Já camundongos NOS2<sup>-/-</sup> não apresentaram variação percentual de peso quando infectados com ZIKV PE243 e SPH, demonstrando que a ausência de NOS2 pode proteger camundongos da infecção por estes vírus, o que não ocorre com a amostra africana, já que os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV MR766 vieram a óbito;
- A detecção de citocinas nos órgãos dos camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> foi distinta entre as amostras de ZIKV, com IFN-γ detectado no cérebro, fígado e baço de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV SPH e MCP-1 detectado no cérebro de camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243, mostrando novamente diferença nas respostas imunes desencadeadas por estas duas amostras. Foi detectado RNA viral em todos os cérebros, no fígado, baço, rim e testículos de camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV PE243 e SPH, comprovando assim a disseminação viral;
- Crianças infectadas com ZIKV apresentaram SNPs nos genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap*, *oas3* e *mcp-1*, sendo que o alelo mutado no SNP no gene *tirap* apresentou maior frequência e o alelo mutado no SNP no gene *tlr3* apresentou menor frequência quando comparado às frequências do banco de dados dbSNP. Crianças infectadas com DENV-1 e DENV-2 apresentaram SNP no gene *tirap*, sendo que nas crianças infectadas com DENV-2, o alelo mutado apresentou maior frequência quando comparado às frequências do banco de dados

dpSNP. Crianças infectadas com SARS-CoV-2 apresentaram SNPs nos genes *tlr3*, *tlr7*, *tirap* e *mcp-1*, sendo que alelo mutado no SNP no gene *tlr3* apresentou menor frequência quando comparado às frequências do banco de dados dbSNP. Estes resultados demonstram a importância do estudo de mutações em genes da imunidade inata para determinar a susceptibilidade às infecções virais.

- As citocinas TNF, IL-10, IL-5 e IL-2 foram detectadas em LCR de crianças infectadas com ZIKV. As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 foram detectadas em LCR de crianças infectadas com DENV. IL-10, uma citocina regulatória, foi a citocina mais detectada e com maior concentração no LCR de crianças infectadas com ZIKV e DENV, o que pode demonstrar uma tentativa de controle da inflamação no SNC.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO JS, SACCHETTO L, REZENDE IM, RODRIGUES RAL, CRISPIM APC, MOURA C, MENDONÇA DC, REIS E, SOUZA F, OLIVEIRA GFG, DOMINGOS I, DE MIRANDA BORATTO PV, SILVA PHB, QUEIROZ VF, MACHADO TB, ANDRADE LAF, LOURENÇO KL, SILVA T, OLIVEIRA GP, DE SOUZA ALVES V, ALVES PA, KROON EG, DE SOUZA TRINDADE G, DRUMOND BP. Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: A potential tool for monitoring the circulation of infected patients"; **Science of the Total Environment**, 766:142645, 2021.
- ADELINO TÉR, GIOVANETTI M, FONSECA V, XAVIER J, DE ABREU ÁS, DO NASCIMENTO VA, DEMARCHI LHF, OLIVEIRA MAA, DA SILVA VL, DE MELLO ALES, CUNHA GM, SANTOS RH, DE OLIVEIRA EC, JÚNIOR JAC, DE MELO IANI FC, DE FILIPPIS AMB, DE ABREU AL, DE JESUS R, DE ALBUQUERQUE CFC, RICO JM, DO CARMO SAID RF, SILVA JA, DE MOURA NFO, LEITE P, FRUTUOSO LCV, HADDAD SK, MARTÍNEZ A, BARRETO FK, VAZQUEZ CC, DA CUNHA RV, ARAÚJO ELL, DE OLIVEIRA TOSTA SF, DE ARAÚJO FABRI A, CHALHOUB FLL, DA SILVA LEMOS P, DE BRUYCKER-NOGUEIRA F, DE CASTRO LICHES GG, ZARDIN MCSU, SEGOVIA FMC, GONÇALVES CCM, GRILLO ZDCF, SLAVOV SN, PEREIRA LA, MENDONÇA AF, PEREIRA FM, DE MAGALHÃES JJF, DOS SANTOS JÚNIOR ACM, DE LIMA MM, NOGUEIRA RMR, GÓES-NETO A, DE CARVALHO AZEVEDO VA, RAMALHO DB, OLIVEIRA WK, MACARIO EM, DE MEDEIROS AC, PIMENTEL V; LATIN AMERICAN GENOMIC SURVEILLANCE ARBOVIRAL NETWORK, HOLMES EC, DE OLIVEIRA T, LOURENÇO J, ALCANTARA LCJ. Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil. **Nat Commun**, 12(1):2296, 2021.
- AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, 4(7):499-511, 2004.
- AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity, **Cell**, 124:783–801, 2006.
- ALAGARASU K, BACHAL RV, MEMANE RS, SHAH PS, CECILIA D. Polymorphisms in RNA sensing toll like receptor genes and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. **Immunobiology**, 220(1):164-8, 2015.
- ALERA MT, HERMANN L, TAC-AN IA, KLUNGTHONG C, RUTVISUTTINUNT W, MANASATIENKIJ W, VILLA D, THAISOMBOONSUK B, VELASCO JM, CHINNAWIROTPISAN P, LAGO CB, ROQUE VG JR, MACAREO LR, SRIKIATKHACHORN A, FERNANDEZ S, YOON IK. Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerg Infect Dis.**, 21(4):722-4, 2015.
- ALIOTA MT, CAINE EA, WALKER EC, LARKIN KE, CAMACHO E, OSORIO JE. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. **PLoS Negl Trop Dis.**, 10(4):e0004682, 2016.
- ALLALI S, MACIEL TT, HERMINE O, DE MONTALEMBERT M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. **Haematologica.**, 105(2):273-283, 2020.
- AMANAT F, KRAMMER F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. **Immunity.**, 14;52(4):583-589, 2020.
- AMARAL DC, RACHID MA, VILELA MC, CAMPOS RD, FERREIRA GP, RODRIGUES DH, LACERDA-QUEIROZ N, MIRANDA AS, COSTA VV, CAMPOS MA, KROON EG, TEIXEIRA MM, TEIXEIRA AL. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. **Journal of Neuroinflammation.**, 8:23, 2011.
- AOSHI T, KOYAMA S, KOBIYAMA K, AKIRA S, ISHII KJ. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. **Current Opinion in Virology**, 1(4):226-32, 2011.
- ARYA R, KUMARI S, PANDEY B, MISTRY H, BIHANI SC, DAS A, PRASHAR V, GUPTA GD, PANICKER L, KUMAR M. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **J Mol Biol.** 433(2):166725, 2021.
- ASAMI J, SHIMIZU T. Structural and functional understanding of the toll-like receptors. **Protein Sci.** 30(4):761-772, 2021.
- ASAO H, Innterleukin-2, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2014.
- ASHOUR J, LAURENT-ROLLE M, SHI PY, GARCÍA-SASTRE A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of Virology**, 83(11):5408-18, 2009.

ASSELTA R, PARABOSCHI EM, MANTOVANI A, DUGA S. *ACE2* and *TMPRSS2* variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. **Aging (Albany NY)**. 12(11):10087-10098, 2020.

AZAR P, MEJÍA JE, CENAC C, SHAIKOVA A, YOUNESS A, LAFFONT S, ESSAT A, IZOPET J, PASSAES C, MÜLLER-TRUTWIN M, DELOBEL P, MEYER L, GUÉRY JC. TLR7 dosage polymorphism shapes interferogenesis and HIV-1 acute viremia in women. **JCI Insight**, 5(12):e136047, 2020.

AZEREDO EL, NEVES-SOUZA PC, ALVARENGA AR, REIS SR, TORRENTES-CARVALHO A, ZAGNE SM, NOGUEIRA RM, OLIVEIRA-PINTO LM, KUBELKA CF. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. **Immunology**, 130(2):202-16, 2010.

BARBALAT R, LAU L, LOCKSLEY RM, BARTON GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. **Nat Immunol.**, 11(6):543, 2010.

BASSET C, HOLTON J, O'MAHONY R, ROITT I. Innate immunity and pathogen-host interaction. **Vaccine**, 21 Suppl 2:S12-23, 2003.

BASTARD P, ZHANG Q, ZHANG SY, JOUANGUY E, CASANOVA JL. Type I interferons and SARS-CoV-2: from cells to organisms. **Curr Opin Immunol.**, 74:172-182, 2022.

BAUER L, LAKSONO BM, DE VRIJ FMS, KUSHNER SA, HARSCHNITZ O, VAN RIEL D. The neuroinvasiveness, neurotropism, and neurovirulence of SARS-CoV-2. **Trends Neurosci.**; 45(5):358-368, 2022.

BESNARD M, EYROLLE-GUIGNOT D, GUILLEMETTE-ARTUR P, LASTÈRE S, BOST-BEZEAUD F, MARCELIS L, ABADIE V, GAREL C, MOUTARD ML, JOUANNIC JM, ROZENBERG F, LEPARC-GOFFART I, MALLETT HP. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. **Euro Surveill.**, 21(13), 2016.

BIYANI S, GARG RK, JAIN A, MALHOTRA HS, KUMAR R, PRAKASH S, VERMA R, SHARMA PK. Toll-like receptor-3 gene polymorphism in patients with Japanese encephalitis. **Journal of Neuroimmunology**, 286:71-6, 2015.

BLASIUS AL, BEUTLER B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, 32(3):305-15, 2010.

BLOMBERG B, MOHN KG, BROKSTAD KA, ZHOU F, LINCHAUSEN DW, HANSEN BA, LARTEY S, ONYANGO TB, KUWELKER K, SÆVIK M, BARTSCH H, TØNDEL C, KITTANG BR; BERGEN COVID-19 Research Group, Cox RJ, Langeland N. Long COVID in a prospective cohort of home-isolated patients. **Nat Med.**; 27(9):1607-1613, 2021.

BOWLUS CL, YANG GX, LIU CH, JOHNSON CR, DHALIWAL SS, FRANK D, LEVY C, PETERS MG, VIERLING JM, GERSHWIN ME. Therapeutic trials of biologics in primary biliary cholangitis: An open label study of abatacept and review of the literature. **J Autoimmun.**, 101:26-34, 2019.

Bradley MP, Nagamine CM. Animal Models of Zika Virus. **Comparative Medicine**, 67(3):242-252, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL – Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19. 2021. Disponível em:[https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/novembro/26/boletim\\_epidemiologico\\_covid\\_90\\_26nov21\\_eapv3b.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/novembro/26/boletim_epidemiologico_covid_90_26nov21_eapv3b.pdf)

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA. Guia de Vigilância em Saúde : volume único. 2019. Disponível em: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico 36: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 39, 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em Saúde no Brasil 2003-2019: Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. 2019. Disponível em: [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs).

BRASIL, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Boletim Epidemiológico 33- Óbitos por arboviroses", v. 51, 2020.

BRASIL, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial: Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019 - Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. 2019. Disponível em: [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs).

BRUBAKER SW, BONHAM KS, ZANONI I, KAGAN JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. **Annu Rev Immunol.**, 33:257-90, 2015.

BURRELL CJ, HOWARD CR, MURPHY FA. Pathogenesis of Virus Infections. **Fenner and White's Medical Virology**, 77-104, 2017.

BURZYN D, RASSA JC, KIM D, NEPOMNASCHY I, ROSS SR, PIAZZON I. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. **Journal of Virology**, 78(2):576-84, 2004.

CALVET G, AGUIAR RS, MELO ASO, SAMPAIO SA, DE FILIPPIS I, FABRI A, ARAUJO ESM, DE SEQUEIRA PC, DE MENDONÇA MCL, DE OLIVEIRA L, TSCHOEKE DA, SCHRAGO CG, THOMPSON FL, BRASIL P, DOS SANTOS FB, NOGUEIRA RMR, TANURI A, DE FILIPPIS AMB. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis.**, 16(6):653-660, 2016.

CAMPOS GS, BANDEIRA AC, SARDI SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, 21(10):1885-6, 2015.

CAMPOS, M. A. et al., "Neurotropic dengue virus infections.". In: SPRINGER (Org.), **Neurotropic viral infections**, 2nd editio ed. [S.l: s.n.], 2016. p. 259–272.

CANDIDO DDS, WATTS A, ABADE L, KRAEMER MUG, PYBUS OG, CRODA J, DE OLIVEIRA W, KHAN K, SABINO EC, FARIA NR. Routes for COVID-19 importation in Brazil. **Journal of Travel Medicine** 27(3), 2020.

CARBAUGH DL, ZHOU S, SANDERS W, MOORMAN NJ, SWANSTROM R, LAZEAR HM. Two Genetic Differences between Closely Related Zika Virus Strains Determine Pathogenic Outcome in Mice. **J Virol.**, 94(20):e00618-20, 2020.

CARTY M, GUY C, BOWIE AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. **Biochem Pharmacol.**, 183:114316, 2021.

CARTY M, REINERT L, PALUDAN SR, BOWIE AG. Innate antiviral signalling in the central nervous system. **Trends Immunol.**, 35(2):79-87, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. (2021a). For Parents: Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) associated with COVID-19. CDC. 2021. <https://www.cdc.gov/mis/mis-c.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. (2021b). **Symptoms of COVID-19**. CDC. 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>

CHANG MT, ASTHANA S, GAO SP, LEE BH, CHAPMAN JS, KANDOTH C, GAO J, SOCCI ND, SOLIT DB, OLSHEN AB, SCHULTZ N, TAYLOR BS. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. **Nat Biotechnol.**, 34(2):155-63, 2016.

CHAPLIN DD. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol.**, 125(2 Suppl 2):S3-23, 2010.

CHEN GP, XIANG K, SUN L, SHI YL, MENG C, SONG L, LIU RS, LI WD, PAN HF. TLR3 polymorphisms are associated with the severity of hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus A71 in a Chinese children population. **J Med Virol.**, 93(11):6172-6179, 2021.

CHEN J, NG MM, CHU JJ. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **PLoS Pathogens**, 11(7):e1005053, 2015.

CHOU SH, BEGHI E, HELBOK R, MORO E, SAMPSON J, ALTAMIRANO V, MAINALI S, BASSETTI C, SUAREZ JI, MCNETT M; GCS-NEUROCOVID CONSORTIUM AND ENERGY CONSORTIUM. Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients Hospitalized With COVID-19-A Report

for the GCS-NeuroCOVID Consortium and the ENERGY Consortium. **JAMA Netw Open.**; 4(5):e2112131, 2021.

CHOWDHURY P, KHAN SA. Significance of CCL2, CCL5 and CCR2 polymorphisms for adverse prognosis of Japanese encephalitis from an endemic population of India. **Scientific Reports**, 7(1):13716, 2017.

COLONNA M, TRINCHIERI G, LIU YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat Immunol.**, 5(12):1219-26, 2004.

CRUZ-OLIVEIRA C, FREIRE JM, CONCEIÇÃO TM, HIGA LM, CASTANHO MA, DA POIAN AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, 39(2):155-70, 2015.

CUGOLA FR, FERNANDES IR, RUSSO FB, FREITAS BC, DIAS JL, GUIMARÃES KP, BENAZZATO C, ALMEIDA N, PIGNATARI GC, ROMERO S, POLONIO CM, CUNHA I, FREITAS CL, BRANDÃO WN, ROSSATO C, ANDRADE DG, FARIA DDE P, GARCEZ AT, BUCHPIGEL CA, BRACONI CT, MENDES E, SALL AA, ZANOTTO PM, PERON JP, MUOTRI AR, BELTRÃO-BRAGA PC. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 534(7606):267-71, 2016.

CUI J, LI F, SHI ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nat Rev Microbiol.**, 17(3):181-192, 2019.

DE MATOS SMS, HENNIGEN AF, WACHHOLZ GE, RENGEL BD, SCHULER-FACCINI L, ROEHE PM, VARELA APM, FRAGA LR. Possible Emergence of Zika Virus of African Lineage in Brazil and the Risk for New Outbreaks. **Front Cell Infect Microbiol.**, 11:680025, 2021

DE MIRANDA AS, RODRIGUES DH, AMARAL DC, DE LIMA CAMPOS RD, CISALPINO D, VILELA MC, LACERDA-QUEIROZ N, DE SOUZA KP, VAGO JP, CAMPOS MA, KROON EG, DA GLÓRIA DE SOUZA D, TEIXEIRA MM, TEIXEIRA AL, RACHID MA. Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice. **Behav Brain Res.**, 230(1):237-42, 2012.

DE OLIVEIRA DB, CANDIANI TM, FRANCO-LUIZ APM, ALMEIDA GMF, ABRAHÃO JS, RIOS M, COIMBRA RS, KROON EG. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. **J Neurol Sci.**, 375:390-394, 2017.

DE PAULA FREITAS B, DE OLIVEIRA DIAS JR, PRAZERES J, SACRAMENTO GA, KO AI, MAIA M, BELFORT R JR. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. **JAMA Ophthalmol.**, 134(5):529-535, 2016.

DE SOUZA KP, SILVA EG, DE OLIVEIRA ROCHA ES, FIGUEIREDO LB, DE ALMEIDA-LEITE CM, ARANTES RM, DE ASSIS SILVA GOMES J, FERREIRA GP, DE OLIVEIRA JG, KROON EG, CAMPOS MA. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. **Virology Journal**, 10:267, 2013.

DE SOUZA KP. Neurovirulência de Dengue virus em modelo murino: fatores virais e resposta do hospedeiro. Tese (Doutorado em Microbiologia), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

DELUDE RL, YOSHIMURA A, INGALLS RR, GOLENBOCK DT. 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**, 161(6):3001-9, 1998.

DEVAL H, ALAGARASU K, MITTAL M, SRIVASTAVA N, BACHAL R, GONDHALEKAR A, CHAUDHARY U, CHOWDHARY D, BONDRE VP. Association of single nucleotide polymorphisms in TNFA and CCR5 genes with Japanese Encephalitis: A study from an endemic region of North India. **J Neuroimmunol.**, 336:577043, 2019.

DICK, G. W. A. "Zika Virus (I). Isolations and serological specificity", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 46(5):509–520, 1952a.

DICK, G. W. A. "ZIKA VIRUS II Pathogenicity and Physical properties", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 46(5):521–534, 1952b.

Dinareello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev.** 281(1):8-27, 2018. DONG S, LIANG Q. Recent Advances in Animal Models of Zika Virus Infection. **Virolog Sin.**, 33(2):125-130, 2018.

DONG Y, MO X, HU Y, QI X, JIANG F, JIANG Z, TONG S. Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. **Pediatrics**,145(6):e20200702, 2020.

DOWALL SD, GRAHAM VA, RAYNER E, ATKINSON B, HALL G, WATSON RJ, BOSWORTH A, BONNEY LC, KITCHEN S, HEWSON R. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. **PLoS Negl Trop Dis.**,10(5):e0004658, 2016.

DRIGGERS RW, HO CY, KORHONEN EM, KUIVANEN S, JÄÄSKELÄINEN AJ, SMURA T, ROSENBERG A, HILL DA, DEBIASI RL, VEZINA G, TIMOFEEV J, RODRIGUEZ FJ, LEVANOV L, RAZAK J, IYENGAR P, HENNENFENT A, KENNEDY R, LANCIOTTI R, DU PLESSIS A, VAPALAHTI O. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **N Engl J Med.**, 74(22):2142-51, 2016.

DROSTEN C, GÜNTHER S, PREISER W, VAN DER WERF S, BRODT HR, BECKER S, RABENAU H, PANNING M, KOLESNIKOVA L, FOUCHIER RA, BERGER A, BURGUIÈRE AM, CINATL J, EICKMANN M, ESCRIOU N, GRYWNA K, KRAMME S, MANUGUERRA JC, MÜLLER S, RICKERTS V, STÜRMER M, VIETH S, KLENK HD, OSTERHAUS AD, SCHMITZ H, DOERR HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **N Engl J Med.**, 348(20):1967-76, 2003.

DULBECCO R, VOGT M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** 18:273-9, 1953.

DUTRA HL, ROCHA MN, DIAS FB, MANSUR SB, CARAGATA EP, MOREIRA LA. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host Microbe**, 19(6):771-4, 2016.

DUTTA SK, TRIPATHI A. Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. **Virology**, 511:207-213, 2017.

ENFISSI A, CODRINGTON J, ROOSBLAD J, KAZANJI M, ROUSSET D. Zika virus genome from the Americas. **The Lancet**, 387(10015):227-8, 2016.

ENLOW W, BORDELEAU M, PIRET J, IBÁÑEZ FG, UYAR O, VENABLE MC, GOYETTE N, CARBONNEAU J, TREMBLAY ME, BOIVIN G. Microglia are involved in phagocytosis and extracellular digestion during Zika virus encephalitis in young adult immunodeficient mice. **J Neuroinflammation.**; 18(1):178, 2021.

FAKHIR FZ, LKHIDER M, BADRE W, ALAOUI R, MEURS EF, PINEAU P, EZZIKOURI S, BENJELLOUN S. Genetic variations in toll-like receptors 7 and 8 modulate natural hepatitis C outcomes and liver disease progression. **Liver Int.**, 38(3):432-442, 2018.

FARIA NR, AZEVEDO RDS, KRAEMER MUG, SOUZA R, CUNHA MS, HILL SC, THÉZÉ J, BONSALE MB, BOWDEN TA, RISSANEN I, ROCCO IM, NOGUEIRA JS, MAEDA AY, VASAMI FG, MACEDO FLL, SUZUKI A, RODRIGUES SG, CRUZ ACR, NUNES BT, MEDEIROS DBA, RODRIGUES DSG, QUEIROZ ALN, DA SILVA EVP, HENRIQUES DF, DA ROSA EST, DE OLIVEIRA CS, MARTINS LC, VASCONCELOS HB, CASSEB LMN, SIMITH DB, MESSINA JP, ABADE L, LOURENÇO J, ALCANTARA LCJ, DE LIMA MM, GIOVANETTI M, HAY SI, DE OLIVEIRA RS, LEMOS PDS, DE OLIVEIRA LF, DE LIMA CPS, DA SILVA SP, DE VASCONCELOS JM, FRANCO L, CARDOSO JF, VIANEZ-JÚNIOR JLD, MIR D, BELLO G, DELATORRE E, KHAN K, CREATORE M, COELHO GE, DE OLIVEIRA WK, TESH R, PYBUS OG, NUNES MRT, VASCONCELOS PFC. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, 352(6283):345-349, 2016.

FEHR AR, PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Methods Mol Biol.**, 1282:1-23, 2015.

FERNANDES NC, NOGUEIRA JS, RÉSSIO RA, CIRQUEIRA CS, KIMURA LM, FERNANDES KR, CUNHA MS, SOUZA RP, GUERRA JM. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. **Exp Toxicol Pathol.**, 69(2):63-71, 2017.

FERNÁNDEZ-MESTRE MT, GENDZEKHADZE K, RIVAS-VETENCOURT P, LAYRISSE Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**; 64(4):469-72, 2004.

FERREIRA GP, FIGUEIREDO LB, COELHO LF, S PA JR, CECILIO AB, FERREIRA PC, BONJARDIM CA, ARANTES RM, CAMPOS MA, KROON EG. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes Infect.**, 12(7):546-54, 2010.

FITZGERALD KA, KAGAN JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. **Cell**, 180(6):1044-1066, 2020.

GALLIEZ RM, SPITZ M, RAFFUL PP, CAGY M, ESCOSTEGUY C, GERMANO CS, SASSE E, GONÇALVES AL, SILVEIRA PP, PEZZUTO P, ORNELAS AM, TANURI A, AGUIAR RS, MOLL FT. Zika Virus Causing Encephalomyelitis Associated With Immunoactivation. **Open Forum Infect Dis.**, 3(4):ofw203, 2016.

GARCÍA-TREJO AR, FALCÓN-LEZAMA JA, JUÁREZ-PALMA L, GRANADOS J, ZÚÑIGA-RAMOS J, RANGEL H, BARQUERA R, VARGAS-ALARCÓN G, RAMOS C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. **Acta Trop.**, 120(1-2):67-71, 2011.

GEWIRTZ AT, NAVAS TA, LYONS S, GODOWSKI PJ, MADARA JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J Immunol.**, 167(4):1882-5, 2001.

GIOVANETTI M, FARIA NR, LOURENÇO J, GOES DE JESUS J, XAVIER J, CLARO IM, KRAEMER MUG, FONSECA V, DELLICOUR S, THÉZÉ J, DA SILVA SALLES F, GRÄF T, SILVEIRA PP, DO NASCIMENTO VA, COSTA DE SOUZA V, DE MELO IANI FC, CASTILHO-MARTINS EA, CRUZ LN, WALLAU G, FABRI A, LEVY F, QUICK J, DE AZEVEDO V, AGUIAR RS, DE OLIVEIRA T, BÔTTO DE MENEZES C, DA COSTA CASTILHO M, TERRA TM, SOUZA DA SILVA M, BISPO DE FILIPPIS AM, LUIZ DE ABREU A, OLIVEIRA WK, CRODA J, CAMPELO DE ALBUQUERQUE CF, NUNES MRT, SABINO EC, LOMAN N, NAVECA FG, PYBUS OG, ALCANTARA LC. Genomic and Epidemiological Surveillance of Zika Virus in the Amazon Region. **Cell Rep.**, 30(7):2275-2283.e7, 2020.

GOLDSMITH CS, TATTI KM, KSIAZEK TG, ROLLIN PE, COMER JA, LEE WW, ROTA PA, BANKAMP B, BELLINI WJ, ZAKI SR. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. **Emerg Infect Dis.**, 10(2):320-6, 2004.

GOMES JA, SGARIONI E, BOQUETT JA, TERÇAS-TRETTEL ACP, DA SILVA JH, RIBEIRO BFR, GALERA MF, DE OLIVEIRA TM, CARVALHO DE ANDRADE MDF, CARVALHO IF, SCHÜLER-FACCINI L, VIANNA FSL. Association between Genetic Variants in *NOS2* and *TNF* Genes with Congenital Zika Syndrome and Severe Microcephaly. **Viruses**; 13(2):325, 2021.

GOUBAU D, DEDDOUCHE S, REIS E SOUSA C. Cytosolic sensing of viruses. **Immunity**, 38(5):855-69, 2013.

GOURINAT AC, O'CONNOR O, CALVEZ E, GOARANT C, DUPONT-ROUZEYROL M. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis.**, 21(1):84-6, 2015.

GRANT A, PONIA SS, TRIPATHI S, BALASUBRAMANIAM V, MIORIN L, SOURISSEAU M, SCHWARZ MC, SÁNCHEZ-SECO MP, EVANS MJ, BEST SM, GARCÍA-SASTRE A. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host Microbe.**, 19(6):882-90, 2016.

GREEN AM, BEATTY PR, HADJILAOU A, HARRIS E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **J Mol Biol.** 426(6):1148-60, 2014.

GUIDOTTI LG, CHISARI FV. Cytokine-mediated control of viral infections. **Virology**, 273(2):221-7, 2000.

GUZMAN MG, GUBLER DJ, IZQUIERDO A, MARTINEZ E, HALSTEAD SB. Dengue infection. **Nat Rev Dis Primers**, 2:16055, 2016.

GUZMAN MG, HARRIS E. Dengue. **Lancet**, 385(9966):453-65, 2015.

HADDOW AD, SCHUH AJ, YASUDA CY, KASPER MR, HEANG V, HUY R, GUZMAN H, TESH RB, WEAVER SC. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis.**, 6(2):e1477, 2012.

HAMEL R, LIÉGEOIS F, WICHIT S, POMPON J, DIOP F, TALIGNANI L, THOMAS F, DESPRÈS P, YSSEL H, MISSÉ D. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. **Microbes Infect.**, 18(7-8):441-9, 2016.

HARWOOD R, ALLIN B, JONES CE, WHITTAKER E, RAMNARAYAN P, RAMANAN AV, KALEEM M, TULLOH R, PETERS MJ, ALMOND S, DAVIS PJ, LEVIN M, TOMETZKI A, FAUST SN, KNIGHT M, KENNY S; PIMS-TS National Consensus Management Study Group. A national consensus management pathway for paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with COVID-19 (PIMS-TS): results of a national Delphi process. **Lancet Child Adolesc Health**, 5(2):133-141, 2021.

HAYASHI F, SMITH KD, OZINSKY A, HAWN TR, YI EC, GOODLETT DR, ENG JK, AKIRA S, UNDERHILL DM, ADEREM A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, 410(6832):1099-103, 2001.

HAYASHIDA E, LING ZL, ASHHURST TM, VIENGKHOU B, JUNG SR, SONGKHUNAWAJ P, WEST PK, KING NJC, HOFER MJ. Zika virus encephalitis in immunocompetent mice is dominated by innate immune cells and does not require T or B cells. **J Neuroinflammation**, 16(1):177, 2019.

HEISE MT. Viral Pathogenesis. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2014.

HISE AG, TRAYLOR Z, HALL NB, SUTHERLAND LJ, DAHIR S, ERMLER ME, MUIRURI S, MUCHIRI EM, KAZURA JW, LABEAUD AD, KING CH, STEIN CM. Association of symptoms and severity of rift valley fever with genetic polymorphisms in human innate immune pathways. **PLoS Negl Trop Dis.**, 9(3):e0003584, 2015.

HONDA K, TAKAOKA A, TANIGUCHI T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. **Immunity**, 25(3):349-60, 2006.

HORNUNG V, GUENTHNER-BILLER M, BOURQUIN C, ABLASSER A, SCHLEE M, UEMATSU S, NORONHA A, MANOHARAN M, AKIRA S, DE FOUGEROLLES A, ENDRES S, HARTMANN G. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. **Nat Med.**, 11(3):263-70, 2005.

HU B, GUO H, ZHOU P, SHI ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **NAT REV MICROBIOL.**, 19(3):141-154, 2022.

HUANG C, WANG Y, LI X, REN L, ZHAO J, HU Y, ZHANG L, FAN G, XU J, GU X, CHENG Z, YU T, XIA J, WEI Y, WU W, XIE X, YIN W, LI H, LIU M, XIAO Y, GAO H, GUO L, XIE J, WANG G, JIANG R, GAO Z, JIN Q, WANG J, CAO B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, 395(10223):497-506, 2020.

IANI FCM, GIOVANETTI M, FONSECA V, SOUZA WM, ADELINO TER, XAVIER J, JESUS JG, PEREIRA MA, SILVA MVF, COSTA AVB, SILVA EC, MENDES MCO, FILIPPIS AMB, ALBUQUERQUE CFC, ABREU AL, OLIVEIRA MAA, ALCANTARA LCJ, FARIA NR. Epidemiology and evolution of Zika virus in Minas Gerais, Southeast Brazil. **Infect Genet Evol.**, 91:104785, 2021.

ICTV. **9th Report (2011)**. 2011. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/).

ICTV. **Virus Taxonomy: 2020 Release**. 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

ISMAIL S; ESSAWI M. Genetic polymorphism studies in humans, **Middle East Journal of Medical Genetics**, 1(2):57-63, 2012.

IWASAKI A, MEDZHITOV R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol.**, 16(4):343-53, 2015.

IWASAKI A, MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol.**, 5(10):987-95, 2004.

IWASAKI A. A virological view of innate immune recognition. **Annu Rev Microbiol.**, 66:177-96, 2012.

- IYER SS, CHENG G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Crit Rev Immunol.** 32(1):23-63, 2012.
- IZMIRLY AM, ALTURKI SO, ALTURKI SO, CONNORS J, HADDAD EK. Challenges in Dengue Vaccines Development: Pre-existing Infections and Cross-Reactivity. **Front Immunol.**, 11:1055, 2020.
- JAFARI KHALJIRI H, JAMALKHAH M, AMINI HARANDI A, PAKDAMAN H, MORADI M, MOWLA A. Comprehensive Review on Neuro-COVID-19 Pathophysiology and Clinical Consequences. **Neurotox Res;** 39(5):1613-1629, 2021.
- JANEWAY CA JR, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.**, 20:197-216, 2002.
- JENSEN S, THOMSEN AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. **Journal of Virology**, 86(6):2900-10, 2012.
- JENSENIUS M, HAN PV, SCHLAGENHAUF P, SCHWARTZ E, PAROLA P, CASTELLI F, VON SONNENBURG F, LOUTAN L, LEDER K, FREEDMAN DO; GeoSentinel Surveillance Network. Acute and potentially life-threatening tropical diseases in western travelers--a GeoSentinel multicenter study, 1996-2011. **Am J Trop Med Hyg.**, 88(2):397-404, 2013.
- KARKI R, PANDYA D, ELSTON RC, FERLINI C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC Med Genomics**, 8:37, 2015.
- KATO GJ, PIEL FB, REID CD, GASTON MH, OHENE-FREMPONG K, KRISHNAMURTI L, SMITH WR, PANEPINTO JA, WEATHERALL DJ, COSTA FF, VICHINSKY EP. Sickle cell disease. **Nat Rev Dis Primers**, 4:18010, 2018.
- KAWAI T, ADACHI O, OGAWA T, TAKEDA K, AKIRA S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity.** 11(1):115-22, 1999.
- KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol.**, 11(5):373-84, 2010.
- KAWAI T, SATO S, ISHII KJ, COBAN C, HEMMI H, YAMAMOTO M, TERAJ K, MATSUDA M, INOUE J, UEMATSU S, TAKEUCHI O, AKIRA S. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nat Immunol.**, 5(10):1061-8, 2004.
- KAZMI SS, ALI W, BIBI N, NOUROZ F. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **J Biol Res (Thessalon)**, 27:5, 2020.
- KENNEDY PG. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 75 Suppl 1(Suppl 1):i10-5, 2004.
- KOSCHINSKI A, WENGLER G, WENGLER G, REPP H. 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. **J Gen Virol.**, 84(Pt 7):1711-1721, 2003.
- KRAEMER MU, SINKA ME, DUDA KA, MYLNE AQ, SHEARER FM, BARKER CM, MOORE CG, CARVALHO RG, COELHO GE, VAN BORTEL W, HENDRICKX G, SCHAFFNER F, ELYAZAR IR, TENG HJ, BRADY OJ, MESSINA JP, PIGOTT DM, SCOTT TW, SMITH DL, WINT GR, GOLDING N, HAY SI. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, 4:e08347, 2015.
- KRUGLYAK L, NICKERSON DA. Variation is the spice of life. **Nat Genet.**, 27(3):234-6, 2001.
- KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, PLETNEV SV, CORVER J, LENCHES E, JONES CT, MUKHOPADHYAY S, CHIPMAN PR, STRAUSS EG, BAKER TS, STRAUSS JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, 108(5):717-25, 2002.
- KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol.**, 30(1):16-34, 2011.
- KUNO G, CHANG GJ, TSUCHIYA KR, KARABATSOS N, CROPP CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of virology**, 72(1):73-83, 1998.

KURT-JONES EA, POPOVA L, KWINN L, HAYNES LM, JONES LP, TRIPP RA, WALSH EE, FREEMAN MW, GOLENBOCK DT, ANDERSON LJ, FINBERG RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nat Immunol.**, 1(5):398-401, 2000.

LAI JH, WANG MY, HUANG CY, WU CH, HUNG LF, YANG CY, KE PY, LUO SF, LIU SJ, HO LJ. Infection with the dengue RNA virus activates TLR9 signaling in human dendritic cells, **EMBO reports**, v.19, n.8, p. 1–17, 2018.

LANCIOTTI RS, KOSOY OL, LAVEN JJ, VELEZ JO, LAMBERT AJ, JOHNSON AJ, STANFIELD SM, DUFFY MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**, 14 (8):1232-9, 2008.

LAURENT-ROLLE M, MORRISON J, RAJSBAUM R, MACLEOD JML, PISANELLI G, PHAM A, AYLLON J, MIORIN L, MARTINEZ C, TENOEVER BR, GARCÍA-SASTRE A. The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. **Cell Host Microbe**, 16(3):314-327, 2014.

LAZEAR HM, GOVERO J, SMITH AM, PLATT DJ, FERNANDEZ E, MINER JJ, DIAMOND MS. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, 19(5):720-30, 2016.

Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. **Immunity**, 50(4):907-923, 2019.

LEE CC, AVALOS AM, PLOEGH HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nat Rev Immunol**, 12(3):168-79, 2021.

LESTER SN, LI K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. **J Mol Biol.**, 426(6):1246-64, 2014.

LI C, XU D, YE Q, HONG S, JIANG Y, LIU X, ZHANG N, SHI L, QIN CF, XU Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, 19(5):672, 2016.

LI GH, NING ZJ, LIU YM, LI XH. Neurological Manifestations of Dengue Infection. **Front Cell Infect Microbiol.**, 7:449, 2017.

LI H, LI Y, WEN B, ZHANG J, WANG C, SONG Z, LI S, QU X, HUANG R, LIU W. Dengue virus and Japanese encephalitis virus infection of the central nervous system share similar profiles of cytokine accumulation in cerebrospinal fluid. **Cent Eur J Immunol.**, 42(2):218-222, 2017.

LI H, LIU L, ZHANG D, XU J, DAI H, TANG N, SU X, CAO B. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. **Lancet**, 395(10235):1517-1520, 2020.

LI H, XUE Q, XU X. Involvement of the Nervous System in SARS-CoV-2 Infection. **Neurotox Res.**, 38(1):1-7, 2020.

LI Q, GUAN X, WU P, WANG X, ZHOU L, TONG Y, REN R, LEUNG KSM, LAU EHY, WONG JY, XING X, XIANG N, WU Y, LI C, CHEN Q, LI D, LIU T, ZHAO J, LIU M, TU W, CHEN C, JIN L, YANG R, WANG Q, ZHOU S, WANG R, LIU H, LUO Y, LIU Y, SHAO G, LI H, TAO Z, YANG Y, DENG Z, LIU B, MA Z, ZHANG Y, SHI G, LAM TTY, WU JT, GAO GF, COWLING BJ, YANG B, LEUNG GM, FENG Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **N Engl J Med.**, 382(13):1199-1207, 2020.

LI W, SHI Z, YU M, REN W, SMITH C, EPSTEIN JH, WANG H, CRAMERI G, HU Z, ZHANG H, ZHANG J, MCEACHERN J, FIELD H, DASZAK P, EATON BT, ZHANG S, WANG LF. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, 310(5748):676-9, 2005.

LIKATH FB, VARATHARAJAN S, PREMKUMAR PS, SYED C, WARD H, KANG G, AJJAMPUR SSR. Toll-Like Receptors and Mannose Binding Lectin Gene Polymorphisms Associated with Cryptosporidial Diarrhea in Children in Southern India. **Am J Trop Med Hyg.**, 105(6):1706-1711, 2021.

LIM JK, LISCO A, MCDERMOTT DH, HUYNH L, WARD JM, JOHNSON B, JOHNSON H, PAPE J, FOSTER GA, KRYSZTOF D, FOLLMANN D, STRAMER SL, MARGOLIS LB, MURPHY PM. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. **PLoS Pathog.**, 5(2):e1000321, 2009.

LIMA MLD, CABRAL ÁS, BITTAR C, FALLEIROS JUNIOR LR, GUERRA LHA, CARNEIRO BM, DE SOUZA FERREIRA LC, NOGUEIRA ML, TABOGA SR, CALMON MF, RAHAL P. Early infection of Zika

virus in the male reproductive system of AG129 mice: molecular and immunohistochemical evaluation. **Braz J Microbiol.** 2022.

LIU Y, MAO B, LIANG S, YANG JW, LU HW, CHAI YH, WANG L, ZHANG L, LI QH, ZHAO L, HE Y, GU XL, JI XB, LI L, JIE ZJ, LI Q, LI XY, LU HZ, ZHANG WH, SONG YL, QU JM, XU JF. Shanghai Clinical Treatment Experts Group for COVID-19. Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. **Eur Respir J.**, 55(5):2001112, 2020.

LIU YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. **Annu Rev Immunol.**, 23:275-306, 2005.

LOPERA MAYA EA, VAN DER GRAAF A, LANTING P, VAN DER GEEST M, FU J, SWERTZ M, FRANKE L, WIJMENGA C, DEELEN P, ZHERNAKOVA A, SANNA S; LIFELINES COHORT STUDY. Lack of Association Between Genetic Variants at *ACE2* and *TMPRSS2* Genes Involved in SARS-CoV-2 Infection and Human Quantitative Phenotypes. **Front Genet.** 11:613, 2020.

LUDVIGSSON JF. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. **Acta Paediatr.**, 109(6):1088-1095, 2020.

LUND JM, ALEXOPOULOU L, SATO A, KAROW M, ADAMS NC, GALE NW, IWASAKI A, FLAVELL RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 101(15):5598-603, 2004.

M. SHIN, J. KIM, J. PARK, AND T.-W. HAHN. Clinical profile of Asian and African strains of Zika virus in immunocompetent mice, **Korean Journal of Veterinary Research**, 61(2):12, 2021.

MACNAMARA FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during

MANANGEESWARAN M, IRELAND DD, VERTHELYI D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. **PLoS Pathog.**, 12(11):e1006004, 2016.

MARINHO PE, BRETAS DE OLIVEIRA D, CANDIANI TM, CRISPIM AP, ALVARENGA PP, CASTRO FC, ABRAHÃO JS, RIOS M, COIMBRA RS, KROON EG. Meningitis Associated with Simultaneous Infection by Multiple Dengue Virus Serotypes in Children, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 23(1):115-118, 2017.

MARINHO PES, ALVARENGA PPM, CRISPIM APC, CANDIANI TMS, ALVARENGA AM, BECHLER IM, ALVES PA, DORNAS FP, DE OLIVEIRA DB, BENTES AA, CHRISTO PP, KROON EG. Wild-Type Yellow Fever Virus RNA in Cerebrospinal Fluid of Child. **Emerg Infect Dis.**, 25(8):1567-1570, 2019.

MARINHO PES, ALVARENGA PPM, LIMA MT, DE SOUZA ANDRADE A, CANDIANI TMS, CRISPIM APC, GASPARINI MCS, CASTRO FS, DE SOUSA AZA, VIEGAS ECC, DE OLIVEIRA DB, CHRISTO PP, KROON EG. Central and peripheral nervous system involvement in Zika virus infection in a child. **J Neurovirol.**, 25(6):893-896, 2019.

MARINHO PES, COSTA GB, CRISPIM APC, ALVARENGA PPM, CANDIANI TMS, ALVARENGA AM, BECHLER IM, ARAUJO ST, GUEDES I, BATISTA AKA, BENTES AA, DE OLIVEIRA DB, KROON EG. The impact of viral infections on childhood central nervous system infections. **J Clin Virol.**, 140:104853, 2021.

MARINHO PES, KROON EG. Flaviviruses as agents of childhood central nervous system infections in Brazil. **New Microbes New Infect.**, 31:100572, 2019.

MARINHO, P.E.S, **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVIRUS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CRIANÇAS COM SUSPEITA DE INFECÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.** Tese (Doutorado em Microbiologia), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2019.

MARRS C, OLSON G, SAADE G, HANKINS G, WEN T, PATEL J, WEAVER S. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. **Am J Perinatol.**, 33(7):625-39, 2016.

MEDZHITOV R, JANEWAY C JR. Innate immunity. **N Engl J Med.**, 343(5):338-44, 2000.

- MEDZHITOV R, JANEWAY CA JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol.**, 9(1):4-9, 1997.
- MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, 449(7164):819-26, 2007.
- MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol.**, 1(2):135-45, 2001.
- MEHTA P, MCAULEY DF, BROWN M, SANCHEZ E, TATTERSALL RS, MANSON JJ; HLH ACROSS SPECIALITY COLLABORATION, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **Lancet**, 395(10229):1033-1034, 2020.
- MEHTA VK, VERMA R, GARG RK, MALHOTRA HS, SHARMA PK, JAIN A. Study of interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with neurological manifestations of dengue. **J Postgrad Med.**, Jan-Mar;63(1):11-15, 2017.
- MESSINA JP, BRADY OJ, SCOTT TW, ZOU C, PIGOTT DM, DUDA KA, BHATT S, KATZELNICK L, HOWES RE, BATTLE KE, SIMMONS CP, HAY SI. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends Microbiol.**, 22(3):138-46, 2014.
- MINISTRY OF HEALTH OF BRAZIL. Health Brazil 2015/2016:an analysis of health situation and the epidemic caused by Zika virus and other diseases transmitted by *Aedes aegypti*. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/health\\_brazil\\_2015\\_2016.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/health_brazil_2015_2016.pdf)
- MISRA S, KOLAPPA K, PRASAD M, RADHAKRISHNAN D, THAKUR KT, SOLOMON T, MICHAEL BD, WINKLER AS, BEGHI E, GUEKHT A, PARDO CA, WOOD GK, HSIANG-YI CHOU S, FINK EL, SCHMUTZHARD E, KHERADMAND A, HOO FK, KUMAR A, DAS A, SRIVASTAVA AK, AGARWAL A, DUA T, PRASAD K. Frequency of Neurologic Manifestations in COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. **Neurology.**; 97(23):e2269-e2281, 2021.
- MLAKAR J, KORVA M, TUL N, POPOVIĆ M, POLJŠAK-PRIJATELJ M, MRAZ J, KOLENC M, RESMAN RUS K, VESNAVER VIPOTNIK T, FABJAN VODUŠEK V, VIZJAK A, PIŽEM J, PETROVEC M, AVŠIČ ŽUPANC T. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med.**, 374(10):951-8, 2016.
- MODHIRAN N, WATTERSON D, MULLER DA, PANETTA AK, SESTER DP, LIU L, HUME DA, STACEY KJ, YOUNG PR. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Sci Transl Med.**, 7(304):304ra142, 2015.
- MOGENSEN TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev.**, 22(2):240-73, 2009.
- MORENS DM, FAUCI AS. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. **Cell**, 182(5):1077-1092, 2020.
- MORRISON TE, DIAMOND MS. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **J Virol.**, 91(8):e00009-17, 2017.
- MUKHERJEE S, TRIPATHI A. Contribution of Toll like receptor polymorphisms to dengue susceptibility and clinical outcome among eastern Indian patients. **Immunobiology.** 224(6):774-785, 2019.
- MUKHOPADHYAY S, KUHN RJ, ROSSMANN MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol.**, 3(1):13-22, 2005.
- MURAWSKI MR, BOWEN GN, CERNY AM, ANDERSON LJ, HAYNES LM, TRIPP RA, KURT-JONES EA, FINBERG RW. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. **Journal of Virology**, 83(3):1492-500, 2009.
- MURPHY, K., TRAVERS, P. **Imunobiologia de Janeway**. 2010. v. 7ª Edição.
- MURRAY K, BARANIUK S, RESNICK M, ARAFAT R, KILBORN C, CAIN K, SHALLENBERGER R, YORK TL, MARTINEZ D, HELLUMS JS, HELLUMS D, MALKOFF M, ELGAWLEY N, MCNEELY W, KHUWAJA SA, TESH RB. Risk factors for encephalitis and death from West Nile virus infection. **Epidemiol Infect.**, 134(6):1325-32, 2006.

MUSTAFÁ YM, MEUREN LM, COELHO SVA, DE ARRUDA LB. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. **Front Microbiol.**, 10:525, 2019.

NASCIMENTO-CARVALHO GC, NASCIMENTO-CARVALHO EC, RAMOS CL, VILAS-BOAS AL, MORENO-CARVALHO OA, VINHAES CL, BARRETO-DUARTE B, QUEIROZ ATL, ANDRADE BB, NASCIMENTO-CARVALHO CM. Zika-exposed microcephalic neonates exhibit higher degree of inflammatory imbalance in cerebrospinal fluid. **Sci Rep.** Apr 19;11(1):8474, 2021.

NAZERAI L, SCHØLLER AS, RASMUSSEN POS, BUUS S, STRYHN A, CHRISTENSEN JP, THOMSEN AR. A new *in vivo* model to study protective immunity to Zika virus infection in mice with intact type I interferon signaling. **Front Immunol.** 22;9:593, 2018.

NAZMI A, DUTTA K, HAZRA B, BASU A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. **Virus Res.**, 185:32-40, 2014.

NGWE TUN MM, NGUYEN TTT, ANDO T, DUMRE SP, SOE AM, BUERANO CC, NGUYEN MT, LE NTN, PHAM VQ, NGUYEN TH, LE TQM, MORITA K, HASEBE F. Clinical, Virological, and Cytokine Profiles of Children Infected with Dengue Virus during the Outbreak in Southern Vietnam in 2017. **Am J Trop Med Hyg.**, 102(6):1217-1225, 2020.

OEHLER E, WATRIN L, LARRE P, LEPARC-GOFFART I, LASTERE S, VALOUR F, BAUDOUIIN L, MALLET H, MUSSO D, GHAWCHE F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill.**, 19(9):20720, 2014.

OLIVEIRA DB, MACHADO G, ALMEIDA GM, FERREIRA PC, BONJARDIM CA, TRINDADE GDE S, ABRAHÃO JS, KROON EG. Infection of the central nervous system with dengue virus 3 genotype 1 causing neurological manifestations in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 49(1):125-9, 2016.

OLIVEIRA MELO AS, MALINGER G, XIMENES R, SZEJNFELD PO, ALVES SAMPAIO S, BISPO DE FILIPPIS AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet Gynecol.**, 47(1):6-7, 2016.

OLIVEIRA, DB. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO PARA MENINGOENCEFALITES VIRAIS POR PCR EM TEMPO REAL.** Tese (Doutorado em Microbiologia), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.

OLSON JG, KSIAZEK TG, SUHANDIMAN, TRIWIBOWO. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 75(3):389-93, 1981.

O'NEILL LA, BOWIE AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.**, 7(5):353-64, 2007.

ONG SWX, TAN YK, CHIA PY, LEE TH, NG OT, WONG MSY, MARIMUTHU K. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. **JAMA**, 323(16):1610-1612, 2020.

PAIRO-CASTINEIRA E, CLOHISEY S, KLARIC L, BRETHERICK AD, RAWLIK K, PASKO D, WALKER S, PARKINSON N, FOURMAN MH, RUSSELL CD, FURNISS J, RICHMOND A, GOUNTOUNA E, WROBEL N, HARRISON D, WANG B, WU Y, MEYNERT A, GRIFFITHS F, OOSTHUYZEN W, KOUSATHANAS A, MOUTSIANAS L, YANG Z, ZHAI R, ZHENG C, GRIMES G, BEALE R, MILLAR J, SHIH B, KEATING S, ZECHNER M, HALEY C, PORTEOUS DJ, HAYWARD C, YANG J, KNIGHT J, SUMMERS C, SHANKAR-HARI M, KLENERMAN P, TURTLE L, HO A, MOORE SC, HINDS C, HORBY P, NICHOL A, MASLOVE D, LING L, MCAULEY D, MONTGOMERY H, WALSH T, PEREIRA AC, RENIERI A; GENOMICC INVESTIGATORS; ISARIC4C INVESTIGATORS; COVID-19 HUMAN GENETICS INITIATIVE; 23ANDME INVESTIGATORS; BRACOVIC INVESTIGATORS; GEN-COVID INVESTIGATORS, SHEN X, PONTING CP, FAWKES A, TENESA A, CAULFIELD M, SCOTT R, ROWAN K, MURPHY L, OPENSHAW PJM, SEMPLE MG, LAW A, VITART V, WILSON JF, BAILLIE JK. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. **Nature.** Mar;591(7848):92-98, 2021.

- PANIRI A, HOSSEINI MM, AKHAVAN-NIAKI H. First comprehensive computational analysis of functional consequences of *TMPRSS2* SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations. **J Biomol Struct Dyn.** 39(10):3576-3593, 2021.
- PARDY RD, RAJAH MM, CONDOTTA SA, TAYLOR NG, SAGAN SM, RICHER MJ. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. **PLoS Pathog.**, 13(2):e1006184, 2017
- PATTNAIK A, SAHOO BR, PATTNAIK AK. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. **Vaccines**, 8(2):266, 2020.
- PEREZ AB, SIERRA B, GARCIA G, AGUIRRE E, BABEL N, ALVAREZ M, SANCHEZ L, VALDES L, VOLK HD, GUZMAN MG. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Hum Immunol.**, 71(11):1135-40, 2010.
- PESSOA NL, BENTES AA, DE CARVALHO AL, DE SOUZA SILVA TB, ALVES PA, DE SOUSA REIS EV, RODRIGUES TA, KROON EG, CAMPOS MA. Case report: hepatitis in a child infected with SARS-CoV-2 presenting toll-like receptor 7 Gln11Leu single nucleotide polymorphism. **Virology**. 18(1):180, 2021.
- PESSOA NL, DINIZ LMO, ANDRADE AS, KROON, EG, BENTES AA, CAMPOS MA. "Children with sickle cell disease and severe COVID-19 presenting single nucleotide polymorphisms in innate immune response genes – A case report", **eJHaem**, 3(1):199–202, 2022.
- PETERSEN LR, JAMIESON DJ, POWERS AM, HONEIN MA. Zika Virus. **N Engl J Med.**, 374(16):1552-63, 2016.
- PIERSON TC, DIAMOND MS. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nat Microbiol.**, 5(6):796-812, 2020.
- PONTERIO E, MARIOTTI S, TABOLACCI C, RUGGERI FM, NISINI R. Virus like particles of GII.4 norovirus bind Toll Like Receptors 2 and 5. **Immunol Lett.**, 215:40-44, 2019.
- PROBERT L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, 302:2-22, 2015.
- RASSA JC, MEYERS JL, ZHANG Y, KUDARAVALLI R, ROSS SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99(4):2281-6, 2002.
- RIPHAGEN S, GOMEZ X, GONZALEZ-MARTINEZ C, WILKINSON N, THEOCHARIS P. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. **Lancet**, 395(10237):1607-1608, 2020.
- RODRIGUES, B., NETO, S. **Conceitos Básicos da Genética**. Editora Atena, 2019.
- ROMERO-SÁNCHEZ CM, DÍAZ-MAROTO I, FERNÁNDEZ-DÍAZ E, SÁNCHEZ-LARSEN Á, LAYOS-ROMERO A, GARCÍA-GARCÍA J, GONZÁLEZ E, REDONDO-PEÑAS I, PERONA-MORATALLA AB, DEL VALLE-PÉREZ JA, GRACIA-GIL J, ROJAS-BARTOLOMÉ L, FERIA-VILAR I, MONTEAGUDO M, PALAO M, PALAZÓN-GARCÍA E, ALCAHUT-RODRÍGUEZ C, SOPELANA-GARAY D, MORENO Y, AHMAD J, SEGURA T. Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: The ALBACOVID registry. **Neurology.**; 95(8):e1060-e1070, 2020.
- ROSSI SL, TESH RB, AZAR SR, MURUATO AE, HANLEY KA, AUGUSTE AJ, LANGSJOEN RM, PAESSLER S, VASILAKIS N, WEAVER SC. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **Am J Trop Med Hyg.**, 94(6):1362-1369, 2016.
- ROUSE BT, SEHRAWAT S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? **Nat Rev Immunol.**, 10(7):514-26, 2010.
- SAHU R, VERMA R, JAIN A, GARG RK, SINGH MK, MALHOTRA HS, SHARMA PK, PARIHAR A. Neurologic complications in dengue virus infection: a prospective cohort study. **Neurology**, 83(18):1601-9, 2014.
- SAIKH KU. MyD88 and beyond: a perspective on MyD88-targeted therapeutic approach for modulation of host immunity. **Immunol Res.**, 69(2):117-128, 2021.

SAIZ JC, VÁZQUEZ-CALVO Á, BLÁZQUEZ AB, MERINO-RAMOS T, ESCRIBANO-ROMERO E, MARTÍN-ACEBES MA. Zika Virus: the Latest Newcomer. **Front Microbiol.**, 7:496, 2016.

SAKUNTABHAI A, TURBPAIBOON C, CASADÉMONT I, CHUANSUMRIT A, LOWHNOO T, KAJASTE-RUDNITSKI A, KALAYANAROOJ SM, TANGNARARATCHAKIT K, TANGTHAWORNCHAIKUL N, VASANAWATHANA S, CHAIYARATANA W, YENCHITSOMANUS PT, SURIYAPHOL P, AVIRUTNAN P, CHOKEPHAIBULKIT K, MATSUDA F, YOKSAN S, JACOB Y, LATHROP GM, MALASIT P, DESPRÉS P, JULIER C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat Genet.**, 37(5):507-13, 2005.

SÁNCHEZ-ARCILA JC, BADOLATO-CORREA J, DE SOUZA TMA, PAIVA IA, BARBOSA LS, NUNES PCG, LIMA MDRQ, DOS SANTOS FB, DAMASCO PV, DA CUNHA RV, AZEREDO EL, DE OLIVEIRA-PINTO LM. Clinical, Virological, and Immunological Profiles of DENV, ZIKV, and/or CHIKV-Infected Brazilian Patients. **Intervirology.** 63(1-6):33-45, 2020.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ MT, CIENFUEGOS-JIMÉNEZ O, ÁLVAREZ-CUEVAS S, PÉREZ-MAYA AA, BORREGO-SOTO G, MARINO-MARTÍNEZ IA. Prevalence of the SNP rs10774671 of the OAS1 gene in Mexico as a possible predisposing factor for RNA virus disease. **Int J Mol Epidemiol Genet.**; 12(3):52-60, 2021.

SANTOS BS, PESSOA NL, LUCINDA N, OLIVEIRA, GC, SILVA TS, ANDRADE KR, GALVÃO BF, ROCHA MN, MACHADO AV, ALVES PA, ALVES AR, KROON EG, CAMPOS MA. Subcutaneous Model for the Study of Dengue Virus Infection in Immune Competent Mice. **Journal of Biosciences and Medicines**, 6:97-110, 2018

SANTOS CNO, RIBEIRO DR, CARDOSO ALVES J, CAZZANIGA RA, MAGALHÃES LS, DE SOUZA MSF, FONSECA ABL, BISPO AJB, PORTO RLS, SANTOS CAD, DA SILVA ÂM, TEIXEIRA MM, DE ALMEIDA RP, DE JESUS AR. Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene. **J Infect Dis.**, 220(11):1797-1801, 2019.

SCHOGGINS JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? **Annu Rev Virol.**, 6(1):567-584, 2019.

SCREATON G, MONGKOLSAPAYA J, YACOUB S, ROBERTS C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nat Rev Immunol.**, 15(12):745-59, 2015.

Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, Subsecretaria de Vigilância e Proteção a Saúde. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika - número 155, Semana Epidemiológica 45. 2019.

SELIGMAN, S. J., BUCHER, D. J. The importance of being outer: Consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E. **Trends in Microbiology.** 2003

SERMAN TM, GACK MU. Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. **Viruses**, 11(10):970, 2019.

SHARP TM, TOMASHEK KM, READ JS, MARGOLIS HS, WATERMAN SH. A New Look at an Old Disease: Recent Insights into the Global Epidemiology of Dengue. **Curr Epidemiol Rep.**, 4(1):11-21, 2017.

SHI Y, WANG Y, SHAO C, HUANG J, GAN J, HUANG X, BUCCI E, PIACENTINI M, IPPOLITO G, MELINO G. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death Differ.**, 27(5):1451-1454, 2020.

SIDDIQI HK, MEHRA MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. **J Heart Lung Transplant.**, 39(5):405-407, 2020.

SIMMONDS, P., BECHER, P., BUKH, J., *et al.* "ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae", **Journal of General Virology**, v. 98, p. 2-3, 2017. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000672>.

SINGH H, KOURY J, KAUL M. Innate Immune Sensing of Viruses and Its Consequences for the Central Nervous System. **Viruses**, 13(2):170, 2021.

SINGH MV, WEBER EA, SINGH VB, STIRPE NE, MAGGIRWAR SB. Preventive and therapeutic challenges in combating Zika virus infection: are we getting any closer? **J Neurovirol.**, 23(3):347-357, 2017.

SKEVAKI C, PARARAS M, KOSTELIDOU K, TSAKRIS A, ROUTSIAS JG. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. **Clin Exp Immunol.**, 180(2):165-77, 2015.

SOLA AM, DAVID AP, ROSBE KW, BABA A, RAMIREZ-AVILA L, CHAN DK. Prevalence of SARS-CoV-2 Infection in Children Without Symptoms of Coronavirus Disease 2019. **JAMA Pediatrics**, 175(2):198-201, 2021.

SOLBRIG MV, PERNG GC. Current neurological observations and complications of dengue virus infection. **Curr Neurol Neurosci Rep.**, 15(6):29, 2015.

SONG BH, YUN SI, WOOLLEY M, LEE YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J Neuroimmunol.**, 308:50-64, 2017.

STUDZIŃSKA M, JABŁOŃSKA A, WIŚNIEWSKA-LIGIER M, NOWAKOWSKA D, GAJ Z, LEŚNIKOWSKI ZJ, WOŹNIAKOWSKA-GEŚICKA T, WILCZYŃSKI J, PARADOWSKA E. Association of TLR3 L412F Polymorphism with Cytomegalovirus Infection in Children. **PLoS One**, 12(1):e0169420, 2017.

SUNDD P, GLADWIN MT, NOVELLI EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu Rev Pathol.**, 14:263-292, 2019.

SZOMOLANYI-TSUDA E, LIANG X, WELSH RM, KURT-JONES EA, FINBERG RW. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. **Journal of Virology**, 80(9):4286-91, 2006.

TAHER I, ALMAEEN A, GHAZY A, ABU-FARHA M, MOHAMED CHANNANATH A, ELSA JOHN S, HEBBAR P, AREFANIAN H, ABUBAKER J, AL-MULLA F, ALPHONSE THANARAJ T. Relevance between COVID-19 and host genetics of immune response. **Saudi J Biol Sci.** 28(11):6645-6652, 2021.

TAKATSU K, KOURO T, NAGAI Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. **Adv Immunol.** 101:191-236, 2009.

TAKATSU K. Cytokine and inflammation: role of IL-5 and its receptor system in inflammation. *Nihon Yakurigaku Zasshi.*, 102(5):301-12, 1993.

TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol.**, 17(1):1-14, 2005.

TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, 140(6):805-20, 2010.

TAPPE D, PÉREZ-GIRÓN JV, ZAMMARCHI L, RISSLAND J, FERREIRA DF, JAENISCH T, GÓMEZ-MEDINA S, GÜNTHER S, BARTOLONI A, MUÑOZ-FONTELA C, SCHMIDT-CHANASIT J. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Med Microbiol Immunol.** 205(3):269-73, 2016.

TAQUET M, GEDDES JR, HUSAIN M, LUCIANO S, HARRISON PJ. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. **Lancet Psychiatry.**; 8(5):416-427, 2021.

TAY MZ, POH CM, RÉNIA L, MACARY PA, NG LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol.**, 20(6):363-374, 2020.

THOMAS SJ, YOON IK. A review of Dengvaxia®: development to deployment. **Hum Vaccin Immunother.**, 15(10):2295-2314, 2019.

THOMPSON MR, KAMINSKI JJ, KURT-JONES EA, FITZGERALD KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. **Viruses**, 3(6):920-40, 2011.

TRIANTAFILOU K, TRIANTAFILOU M. Coxsackievirus B4-induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. **Journal of Virology**, 78(20):11313-20, 2004.

UMAKANTHAN S, SAHU P, RANADE AV, BUKELO MM, RAO JS, ABRAHAO-MACHADO LF, DAHAL S, KUMAR H, KV D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Postgrad Med J.**, 96(1142):753-758, 2020.

VAN DER HOEK L, PYRC K, JEBBINK MF, VERMEULEN-OOST W, BERKHOUT RJ, WOLTHERS KC, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, KAANDORP J, SPAARGAREN J, BERKHOUT B. Identification of a new human coronavirus. **Nat Med.**, 10(4):368-73, 2004.

VAN DER MADE CI, SIMONS A, SCHUURS-HOEIJMAKERS J, VAN DEN HEUVEL G, MANTERE T, KERSTEN S, VAN DEUREN RC, STEEHOUWER M, VAN REIJMERSDAL SV, JAEGER M, HOFSTE T, ASTUTI G, COROMINAS GALBANY J, VAN DER SCHOOT V, VAN DER HOEVEN H, HAGMOLEN OF TEN HAVE W, KLIJN E, VAN DEN MEER C, FIDDELAERS J, DE MAST Q, BLEEKER-ROVERS CP, JOOSTEN LAB, YNTEMA HG, GILISSEN C, NELEN M, VAN DER MEER JWM, BRUNNER HG, NETEA MG, VAN DE VEERDONK FL, HOISCHEN A. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. **JAMA.**; 324(7):663-673, 2020.

VAN LEUR SW, HEUNIS T, MUNNUR D, SANYAL S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, 12(1):2814-2838, 2021.

VARATHARAJ A, THOMAS N, ELLUL MA, DAVIES NWS, POLLAK TA, TENORIO EL, SULTAN M, EASTON A, BREEN G, ZANDI M, COLES JP, MANJI H, AL-SHAHI SALMAN R, MENON DK, NICHOLSON TR, BENJAMIN LA, CARSON A, SMITH C, TURNER MR, SOLOMON T, KNEEN R, PETT SL, GALEA I, THOMAS RH, MICHAEL BD; CORONERVE STUDY GROUP. Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study. **Lancet Psychiatry.**; 7(10):875-882, 2020.

VARUN, V, SUSHMA S, VISHAL S, ALPANA SK. Hepatitis: An emerging presentation in child with coronavirus disease 2019", **Indian J Child Health**, 8(3):139–141, 2021.

VENTURA CV, MAIA M, BRAVO-FILHO V, GÓIS AL, BELFORT R JR. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **Lancet**, 387(10015):228, 2016.

VINER RM, WHITTAKER E. Kawasaki-like disease: emerging complication during the COVID-19 pandemic. **Lancet**, 395(10239):1741-1743, 2020.

V'KOVSKI P, KRATZEL A, STEINER S, STALDER H, THIEL V. CORONAVIRUS biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol.**, 19(3):155-170, 2021.

VON GIESEN, H.-J. **Neurotropic Viral Infections.** v.66., 2016.

WAGNER H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. **Trends Immunol.**, 25(7):381-6, 2004.

WANG B, THURMOND S, ZHOU K, SÁNCHEZ-APARICIO MT, FANG J, LU J, GAO L, REN W, CUI Y, VEIT EC, HONG H, EVANS MJ, O'LEARY SE, GARCÍA-SASTRE A, ZHOU ZH, HAI R, SONG J. Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. **Nat Struct Mol Biol.**, 27(10):875-885, 2020.

WANG JP, KURT-JONES EA, SHIN OS, MANCHAK MD, LEVIN MJ, FINBERG RW. Varicella-zoster virus activates inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages via Toll-like receptor 2. **Journal of Virology**, 79(20):12658-66, 2005.

WHITTAKER E, BAMFORD A, KENNY J, KAFOROU M, JONES CE, SHAH P, RAMNARAYAN P, FRAISSE A, MILLER O, DAVIES P, KUCERA F, BRIERLEY J, MCDUGALL M, CARTER M, TREMOULET A, SHIMIZU C, HERBERG J, BURNS JC, LYALL H, LEVIN M; PIMS-TS STUDY GROUP AND EUCLIDS AND PERFORM CONSORTIA. Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2. **JAMA**, 324(3):259-269, 2020.

WHO. "COVID-19: what is next for public health?", **The Lancet**, v. 395, p. 542–545, 2020b.

WHO. "Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control", **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. 147, 2009.

WHO. "Zika virus outbreaks in the Americas", **Weekly Epidemiological Record**, v. 45, p. 609–610, 2015.

WHO. **Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report - 51.** 2020a.

WHO. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. 28 fev. 2022.

WU A, PENG Y, HUANG B, DING X, WANG X, NIU P, MENG J, ZHU Z, ZHANG Z, WANG J, SHENG J, QUAN L, XIA Z, TAN W, CHENG G, JIANG T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host Microbe**, 27(3):325-328, 2020.

WU C, CHEN X, CAI Y, XIA J, ZHOU X, XU S, HUANG H, ZHANG L, ZHOU X, DU C, ZHANG Y, SONG J, WANG S, CHAO Y, YANG Z, XU J, ZHOU X, CHEN D, XIONG W, XU L, ZHOU F, JIANG J, BAI C, ZHENG J, SONG Y. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Intern Med.**, 180(7):934-943, 2020.

WU F, ZHAO S, YU B, CHEN YM, WANG W, SONG ZG, HU Y, TAO ZW, TIAN JH, PEI YY, YUAN ML, ZHANG YL, DAI FH, LIU Y, WANG QM, ZHENG JJ, XU L, HOLMES EC, ZHANG YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, 579(7798):265-269, 2020.

YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, HOSHINO K, KAISHO T, SANJO H, TAKEUCHI O, SUGIYAMA M, OKABE M, TAKEDA K, AKIRA S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, 301(5633):640-3., 2003.

YAMAMOTO M, SATO S, MORI K, HOSHINO K, TAKEUCHI O, TAKEDA K, AKIRA S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol.**, 169(12):6668-72, 2002.

ZAKI AM, VAN BOHEEMEN S, BESTEBROER TM, OSTERHAUS AD, FOUCHIER RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **N Engl J Med.**, 367(19):1814-20, 2012.

ZANLUCA C, DOS SANTOS CN. Zika virus - an overview. **Microbes Infect.**, 18(5):295-301, 2016.

ZANLUCA C, MELO VC, MOSIMANN AL, SANTOS GI, SANTOS CN, LUZ K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110(4):569-72, 2015.

ZHANG Q, BASTARD P, LIU Z, LE PEN J, MONCADA-VELEZ M, CHEN J, OGISHI M, SABL I, HODEIB S, KOROL C, ROSAIN J, BILGUVAR K, YE J, BOLZE A, BIGIO B, YANG R, ARIAS AA, ZHOU Q, ZHANG Y, ONODI F, KORNIOTIS S, KARP L, PHILIPPOT Q, CHBIHI M, BONNET-MADIN L, DORGHAM K, SMITH N, SCHNEIDER WM, RAZOOKY BS, HOFFMANN HH, MICHAELIDIS E, MOENS L, HAN JE, LORENZO L, BIZIEN L, MEADE P, NEEHUS AL, UGURBIL AC, CORNEAU A, KERNER G, ZHANG P, RAPAPORT F, SEELEUTHNER Y, MANRY J, MASSON C, SCHMITT Y, SCHLÜTER A, LE VOYER T, KHAN T, LI J, FELLAY J, ROUSSEL L, SHAHROOEI M, ALOSAMI MF, MANSOURI D, AL-SAUD H, AL-MULLA F, ALMOURFI F, AL-MUHSAN SZ, ALSOHIME F, AL TURKI S, HASANATO R, VAN DE BEEK D, BIONDI A, BETTINI LR, D'ANGIO' M, BONFANTI P, IMBERTI L, SOTTINI A, PAGHERA S, QUIROS-ROLDAN E, ROSSI C, OLER AJ, TOMPKINS MF, ALBA C, VANDERNOOT I, GOFFARD JC, SMITS G, MIGEOTTE I, HAERYNCK F, SOLER-PALACIN P, MARTIN-NALDA A, COLOBRAN R, MORANGE PE, KELES S, ÇÖLKESEN F, OZCELIK T, YASAR KK, SENOGLU S, KARABELA ŞN, RODRÍGUEZ-GALLEGO C, NOVELLI G, HRAIECH S, TANDJAOUI-LAMBIOTTE Y, DUVAL X, LAOUÉAN C; COVID-STORM CLINICIANS; COVID CLINICIANS; IMAGINE COVID GROUP; FRENCH COVID COHORT STUDY GROUP; COV-CONTACT COHORT; AMSTERDAM UMC COVID-19 BIOBANK; COVID HUMAN GENETIC EFFORT; NIAID-USUHS/TAGC COVID IMMUNITY GROUP, SNOW AL, DALGARD CL, MILNER JD, VINH DC, MOGENSEN TH, MARR N, SPAAN AN, BOISSON B, BOISSON-DUPUIS S, BUSTAMANTE J, PUEL A, CIANCANELLI MJ, MEYTS I, MANIATIS T, SOUMELIS V, AMARA A, NUSSENZWEIG M, GARCÍA-SASTRE A, KRAMMER F, PUJOL A, DUFFY D, LIFTON RP, ZHANG SY, GOROCHOV G, BÉZIAT V, JOUANGUY E, SANCHO-SHIMIZU V, RICE CM, ABEL L, NOTARANGELO LD, COBAT A, SU HC, CASANOVA JL. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, 370(6515):eabd4570, 2020.

ZHANG Q, XIANG R, HUO S, ZHOU Y, JIANG S, WANG Q, YU F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal Transduct Target Ther.**, 6(1):233, 2021.

ZHANG SY, JOUANGUY E, UGOLINI S, SMAHI A, ELAIN G, ROMERO P, SEGAL D, SANCHO-SHIMIZU V, LORENZO L, PUEL A, PICARD C, CHAPGIER A, PLANCOULAIN S, TITEUX M, COGNET C, VON BERNUTH H, KU CL, CASROUGE A, ZHANG XX, BARREIRO L, LEONARD J, HAMILTON C, LEBON P, HÉRON B, VALLÉE L, QUINTANA-MURCI L, HOVNANIAN A, ROZENBERG

- F, VIVIER E, GEISSMANN F, TARDIEU M, ABEL L, CASANOVA JL. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. **Science**. 317(5844):1522-7, 2007.
- ZHANG Y, CORVER J, CHIPMAN PR, ZHANG W, PLETNEV SV, SEDLAK D, BAKER TS, STRAUSS JH, KUHN RJ, ROSSMANN MG. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J**, 22(11):2604-13, 2003.
- ZHONG NS, ZHENG BJ, LI YM, POON, XIE ZH, CHAN KH, LI PH, TAN SY, CHANG Q, XIE JP, LIU XQ, XU J, LI DX, YUEN KY, PEIRIS, GUAN Y. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **Lancet**, 362(9393):1353-8, 2003.
- ZHOU H, YANG J, ZHOU C, CHEN B, FANG H, CHEN S, ZHANG X, WANG L, ZHANG L. A Review of SARS-CoV2: Compared With SARS-CoV and MERS-CoV. **Front Med**, 8:628370, 2021.
- ZHOU J, LIU C, SUN Y, HUANG W, YE K. Cognitive disorders associated with hospitalization of COVID-19: Results from an observational cohort study. **Brain Behav Immun**. 91:383-392, 2021.
- ZHOU S, KURT-JONES EA, MANDELL L, CERNY A, CHAN M, GOLENBOCK DT, FINBERG RW. MyD88 is critical for the development of innate and adaptive immunity during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. **Eur J Immunol.**, 35(3):822-30, 2005.
- ZHU N, ZHANG D, WANG W, LI X, YANG B, SONG J, ZHAO X, HUANG B, SHI W, LU R, NIU P, ZHAN F, MA X, WANG D, XU W, WU G, GAO GF, TAN W; CHINA NOVEL CORONAVIRUS INVESTIGATING AND RESEARCH TEAM. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med.**, 382(8):727-733, 2020.
- ZMURKO J, MARQUES RE, SCHOLS D, VERBEKEN E, KAPTEIN SJ, NEYTS J. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. **PLoS Negl Trop Dis.**, 10(5):e0004695, 2016.
- ZOLINI GP, LIMA GK, LUCINDA N, SILVA MA, DIAS MF, PESSOA NL, COURA BP, CARTELLE CT, ARANTES RM, KROON EG, CAMPOS MA. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. **J Neuroinflammation**, 11:20, 2014.

## **8. ANEXOS**

## 8.1. ANEXO I - CERTIFICADOS COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PRPQ  
PRÓ-REITORIA  
DE PESQUISA

UFMG

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Protocolo CEUA: 381/2018

### 3 Grupos de Animais

3.1 Grupo	3.2 Nome vulgar	3.2.1 Outro	3.3 Quantidade	3.4 Raça ou linhagem	3.4.1 Raça ou linhagem (Inglês)	3.5 Sexo	3.6 Idade	3.7 Massa corporal	3.9 Invasividade
8390 - Infecção Intracraniana Com ZIKV PE243 – Curva De Sobrevida E Perda De Peso	Camundongo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8391 - Infecção Intracraniana Com ZIKV SPH – Curva De Sobrevida E Perda De Peso	Camundongo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8394 - Infecção Intracraniana Com ZIKV MR766 – Curva De Sobrevida E Perda De Peso	Camundongo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8396 - Infecção Intracraniana Grupo Controle – Curva De Sobrevida	Camundongo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3

ncia E Perda De Peso									
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8399 - Infecção S ubcutânea Com ZIKV PE243 – Curva De Sobrevivê ncia E Perda De Peso	Camundo ngo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI2
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8400 - Infecção S ubcutânea Com ZIKV SPH – Curva De Sobrevivê ncia E Perda De Peso	Camundo ngo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI2
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8401 - Infecção S ubcutânea Com ZIKV MR766 – Curva De Sobrevivê ncia E Perda De Peso	Camundo ngo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI2
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8402 - Infecção S ubcutânea Grupo Controle – Curva De Sobrevivê ncia E Perda De Peso	Camundo ngo isogênico		22	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI2
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								

8403 - ZIKV PE243 – Quantifica ção Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs IC	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8404 - ZIKV SPH – Quantific ação Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs IC	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8405 - ZIKV MR766 – Quantifica ção Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs IC	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8406 - Grupo Controle - Quantifica ção Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs IC	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8407 - ZIKV PE243 – Coloração Por Hemat oxilina E Eosina (HE), Análise Hi stopatológ	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (dias)	15 g	GI3

ica E Morfometria IC									
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8408 - ZIKV SPH – Coloração Por Hematxilina E Eosina (HE), Análise Histopatológica E Morfometria IC	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8409 - ZIKV MR766 – Coloração Por Hematxilina E Eosina (HE), Análise Histopatológica E Morfometria IC	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8410 - Grupo Controle – Coloração Por Hematxilina E Eosina (HE), Análise Histopatológica E Morfometria IC	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (dias)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8411 - ZIKV PE243 – Quantificação De Citocinas E	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3

Isolamento De Células Do Cérebro E Baço IC									
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8412 - ZIKV SPH – Quantificação De Citocinas E Isolamento De Células Do Cérebro E Baço IC	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8413 - ZIKV MR766 – Quantificação De Citocinase E Isolamento De Células Do Cérebro E Baço IC	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8414 - Grupo Controle - Quantificação De Citocinase E Isolamento De Células Do Cérebro E Baço IC	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Procedência</b>	Biotério Central da UFMG								
8415 - Ca	Camundo		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6	15 g	GI2

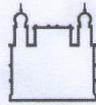
mundongo s Para Retirada De Macróf agos Perít oneais	ngo isogênico						(semanas)		
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8919 - ZIKV PE243 – Quantifica ção Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs S.c.	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8920 - ZIKV SPH – Quantific ação Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs S.c.	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8921 - ZIKV MR766 – Quantifica ção Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs S.c.	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8922 - Grupo Controle - Quantifica ção Do RNA Viral E Do MRNA De TLRs S.c.	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8923 -	Camundo		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6	15 g	GI3

ZIKV PE243 – Coloração Por Hemat oxilina E Eosina (HE), Análise Hi stopatológ ica E Morf ometria S.c.	ngo isogênico						(semanas)		
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8924 - ZIKV SPH – Coloração Por Hemat oxilina E Eosina (HE), Análise Hi stopatológ ica E Morf ometria S.c.	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8925 - ZIKV MR766 – Coloração Por Hemat oxilina E Eosina (HE), Análise Hi stopatológ ica E Morf ometria S.c.	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8926 - Grupo Controle – Coloração Por Hemat oxilina E Eosina (HE), Análise Hi stopatológ	Camundo ngo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3

ica E Morfometria S.c									
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8927 - ZIKV PE243 – Quantificação De Citocinas E Isolamento De Células Do Cérebro E Baço S.c.	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8928 - ZIKV SPH – Quantificação De Citocinas E Isolamento De Células Do Cérebro E Baço S.c.	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8929 - ZIKV MR766 – Quantificação De Citocinase E Isolamento De Células Do Cérebro E Baço S.c.	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								
8930 - Grupo Controle - Quantificação	Camundongo isogênico		11	C57BL/6	C57BL/6	masculino	6 (semanas)	15 g	GI3

ção De Citocinase E Isolament o De Células Do Cérebro E Baço S.c.									
<b>3.8 Proce dência</b>	Biotério Central da UFMG								

--> Índice



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: 18,000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 88 Machos de 129 Sv/Ev, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 88 Machos de 129 TRIF, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 88 Machos de MYD-/, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 88 Machos de TLR2/TLR9 KO, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 88 Machos de B6. 129 P2 - Nos2, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,000.

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

## 8.2. ANEXO II – ARTIGOS PUBLICADOS

Pessoa et al. *Virology Journal* (2021) 18:180  
<https://doi.org/10.1186/s12985-021-01656-3>

Virology Journal

## CASE REPORT

## Open Access



## Case report: hepatitis in a child infected with SARS-CoV-2 presenting toll-like receptor 7 Gln11Leu single nucleotide polymorphism

Natália Lima Pessoa<sup>1,2†</sup>, Aline Almeida Bentes<sup>3,4†</sup>, Andrea Lucchesi de Carvalho<sup>4</sup>, Thaís Bárbara de Souza Silva<sup>2</sup>, Pedro Augusto Alves<sup>2</sup>, Erik Vinicius de Sousa Reis<sup>2</sup>, Tayse Andrade Rodrigues<sup>1,5</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup> and Marco Antônio Campos<sup>2\*</sup>

### Abstract

**Background:** Covid-19 has the respiratory tract as the main target of infection, and patients present mainly dyspnea, pneumonia, dry cough, and fever. Nevertheless, organs outside the respiratory tract had been reported in recent studies, including the gastrointestinal tract and liver. The host innate immune system recognizes pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through their pattern recognition receptor (PRRs). Toll-like receptor 7 (TLR-7) is a pattern recognition receptor recognizing ssRNA (SARS-CoV-2 is an ssRNA). Polymorphisms are characterized by two or more alternative forms of a distinct phenotype in the same population. Polymorphisms in *tirs* genes can negatively influence the immune response to infectious diseases. There are several references in the literature to non-synonymous single nucleotide (rs) polymorphisms related to several genes. Some of them are important for the innate immunity, as rs 179008 (*tlr-7*), rs3775291 (*tlr3*), rs8177374 (*tir domain-containing adaptor protein, tirap*), rs1024611 (*monocyte chemoattractant protein-1, mcp-1*) and rs61942233 (*2'-5'-oligoadenylate synthase-3, oas-3*).

**Case presentation:** We identified a 5-year-old-male child with gastrointestinal symptoms and fever presenting acholic stool and jaundice, who was positive for SARS-CoV-2 IgM, IgA, and IgG and presenting the Gln11Leu rs 179008 in *tlr-7*. The child presented high levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, bilirubin, C-reactive protein, D-dimer, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, and was negative for serological tests for hepatitis A, B, C, E, HIV 1 and 2, herpes virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and negative for RTqPCR for Influenza A and B, RSV and SARS-CoV-2. We also investigated other SNPs in the *tlr-3* (rs3775291), *tirap* (rs8177374), *mcp-1* (rs1024611), and *oas-3* (rs61942233) genes, and no mutation was detected. After an interview with the child's caregivers, any possible accidental ingestion of drugs or hepatotoxic substances was ruled out.

**Conclusion:** To our knowledge, this is the first report of a SARS-CoV-2 caused hepatitis in a male child that has the *tlr-7* Gln11Leu rs 179008, which could impair an efficient initial immune response. The knowledge of the patient's immune deficiency could improve the treatment to correct this deficiency with specific medications.

**Keywords:** SARS-CoV-2, Covid-19, Hepatitis, Single nucleotide polymorphism, TLR-7, Children, Innate immune defense, rs 179008, Toll-like receptor 7 Gln11Leu

\*Correspondence: marco.campos@focruz.br

<sup>†</sup>Natália Lima Pessoa and Aline Almeida Bentes have contributed equally to this work

<sup>2</sup>Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil

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

### Background

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a significant global public health problem. The severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), a



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. 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 in a credit line to the data.

single-stranded RNA (ssRNA) virus, has the respiratory tract as the main target of infection, and patients present mainly dyspnea, pneumonia, dry cough, and fever [1]. Nevertheless, the involvement of organs outside the respiratory tract had been reported in recent studies, including the gastrointestinal tract and liver [2–4]. Liver damage of varying degrees was present in 58–78% of patients [3].

The host immune response to SARS-CoV-2 infection plays an important role in the severity of the disease [5]. It is responsible for recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through their pattern recognition receptor (PRRs). Toll-like receptor 7 (TLR-7) is a PRR that recognizes ssRNA [6]. Polymorphisms are characterized by two or more alternative forms of a distinct phenotype in the same population, and polymorphisms in TLRs can negatively influence the immune response to infectious diseases [7]. There are several references in the literature to non-synonymous single nucleotide (rs) polymorphisms related to several genes (<https://www.genecards.org/>). Some of them are important for the innate immunity, as rs179008 (*tlr-7*), rs3775291 (*tlr3*), rs8177374 (*tir domain-containing adaptor protein, tirap*), rs1024611 (*monocyte chemoattractant protein-1, mcp-1*) and rs61942233 (*2'-5'-oligoadenylate synthase-3, oas-3*) (<https://www.genecards.org/>).

Unique loss-of-function variants in X chromosomal *tlr-7* were identified in four young men with severe COVID-19 [8], and rs179008 in *tlr-7* gene have been related with increased risk to progress to advanced liver disease in hepatitis C virus (HCV) infection [9]. In the present case report, we identified a male child with the *tlr-7* gene Gln11Leu single nucleotide polymorphism (rs 179008) with hepatitis and positive serological SARS-CoV-2 test. We also investigated other SNPs in the *tlr-3*, *tirap*, *MCP-1*, and *oas-3* genes, and no mutation was detected.

### Case presentation

A 5-years-old male child started with fever, odynophagia, diarrhea, abdominal pain, and vomiting on August 19, 2020. On the 23rd, still with fever, he developed acholic stool and jaundice. The child was hospitalized after medical evaluation and tests that detected hepatitis. The patient has asthma and extensively used beclomethasone spray at a low dose of 100 mcg/day. He had no other diseases, and this was his first hospital stay. On the child's vaccination card, there was one dose of hepatitis A and three doses of hepatitis B. After an interview with the child's caregivers, any possible accidental ingestion of drugs or hepatotoxic substances was also ruled out.

The child remained hospitalized for supportive treatment and tests for 4 days, being discharged with improvement in fever, vomiting, and abdominal pain. However,

the child was admitted again 4 days later because he had fever, tiredness, and edema in the lower limbs. He was discharged after 3 days. There was no bleeding or hemodynamic failure at any time. The patient received only supportive treatment.

To investigate the possible cause of this hepatitis in this patient, serological tests for viral hepatitis (hepatitis A, B, C, E, HIV-1 and -2, EBV, and CMV), and tests to evaluate possible autoimmune hepatitis, Wilson's disease, and alpha1-antitrypsin deficiency, were performed (Table 1). All these tests were negative. The child shows a positive IgG for EBV and CMV. As the boy had one positive epidemiology for Covid-19 associated with fever, odynophagia and changes in inflammatory markers, coagulation profile, and D-dimer, a serological test was requested and was positive for IgM, IgG, and IgA for SARS-CoV-2, with the kits Biolisa-CoV-2 IgM, Biolisa-CoV-2 IgG, and Biolisa-CoV2 IgA (Bioclin, Quibasa, Brazil), respectively. The RT-qPCR for SARS-CoV-2 was performed from the nasopharynx and oropharynx 6 days after symptoms and was negative (Table 1). An echocardiogram was performed due to the possibility of multisystem inflammatory syndrome associated with covid-19, but the exam did not show changes in cardiac function or coronary dilation. After hospital discharge, the patient continues to be followed up on an outpatient clinic with a pediatric gastroenterology team, but without other clinical manifestations. The patient underwent cholangioresonance examination in January 2021, but the examination did not show any changes. At this time, the antinuclear antibody was also not reactive. Other diagnostic tests performed for differential diagnoses such as Wilson's disease, alpha-1-antitrypsin deficiency, autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis were negative.

SNPs were selected based on previously reported associations with higher susceptibility of the host to other viral infections and with *tlr* genes, and proteins from the TLR activated cascade. Thereby, SNP rs179008 in the *tlr-7* gene, rs3775291 in the *tlr-3* gene, rs8177374 in the *tirap* gene, rs1024611 in the *mcp-1* gene, and rs61942233 in the *oas-3* gene were tested. The primers used were: 5'-AGAGAGGCAGCAAATGGGAA-3' and 5'-TAGGAA ACCATCTAGCCCCA-3' for *tlr-7*, 5'-GCGAATTT GACAAATGAAACA -3' and 5'-CCCAACCAAGAG AAAGCATC-3' for *tlr-3*, 5'-GGTGCAAGTACCAGATGCT-3' and 5'-CAACGCATGACAGCTTCTTT-3' for *tirap*, 5'-CTTCTCTCACGCCAGCAC-3' and 5'-ACAGTAAACACAGGGAAGGT-3' for *mcp-1* and 5'-GCTGCTTCAGCCAGTTCA-3' and 5'-GTCAGTGAGAAG CTCAGCA-3' for *oas-3*. To detect SNPs, genomic DNA was extracted from peripheral blood, amplified by polymerase chain reaction (PCR), and sequenced. The genotype was confirmed by aligning the resulted sequence

**Table 1** Laboratory results, hepatitis tests, serological tests, and single nucleotide polymorphism genotype and phenotype

Tests (units)/dates	08/24–26	09/02	11/18	Reference range
Hemoglobin (g/dL)	12.8	10.7	12.9	11.5–13.5
Leukocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	10,030	8450	6170	5000–14,500
Platelets (cells/mm <sup>3</sup> )	369,000	589,000	432,000	150,000–400,000
C-Reactive protein (mg/L)	<b>233</b>	62	–	< 12
Aspartate aminotransferase (IU/L)	<b>326</b>	48	33	10–47
Alanine aminotransferase (IU/L)	<b>234</b>	49	19	24–49
Bilirubin/direct bilirubin (mg/dL)	<b>4.4/4.0</b>	0.9/ <b>0.6</b>	0/0	≤ 1.2/≤ 0.4
Gamma-glutamyl transferase (IU/L)	<b>833</b>	<b>239</b>	22	< 30
Alkaline phosphatase (IU/L)	<b>770</b>	329	253	142–335
Albumin (g/dL)	3.9	3.9	4.3	2.9–4.7
Activated partial thromboplastin time (s)	<b>69</b>	<b>62</b>	<b>77</b>	25–35
International normalized ratio (INR)	<b>1.28</b>	<b>1.38</b>	<b>1.3</b>	0.87–1.2
D-dimer (mcg/mL)	<b>1.46</b>	<b>1.83</b>	–	≤ 0.5
α1-Antitrypsin (mg/L)	<b>293</b>	–	–	78–200
Ceruloplasmin (mg/dL)	36	–	–	20–60
Antinuclear antibody	<b>1:80</b>	–	–	NR
Anti-smooth muscle	NR	–	–	NR
Serum copper (mcg/dL)	177	–	–	90–190
Urinary copper (mcg/24 hs)	11	–	–	≤ 60
Anti-liver kidney microsome type 1	–	NR	–	NR
SARS-CoV-2 IgG/IgA/IgM	<b>P/P/P</b>	–	–	N
VDRL	N	–	–	N
RTqPCR influenza A, B, RSV and SARS-CoV2	N/N/N	–	–	N/N/N
Anti-human immunodeficiency virus 1,2	N	–	–	N
Anti-hepatitis A virus/C virus	N/N	–	–	N/N
Anti-hepatitis E IgM	N	–	–	N
Hepatitis B, HBsAg, anti-HBc-IgM	N/N/N	–	–	N/N/N
Anti-human herpes virus IgM	N	–	–	N
Anti-cytomegalovirus IgG/IgM	P/N	–	–	N
Anti-Epstein-Barr virus IgG/IgM	P/N	–	–	N
TLR-7 T/T (A/A)	–	–	<b>M</b>	–
TLR-3 C/C (C/C)	–	–	NH	–
TIRAP C/C (C/C)	–	–	NH	–
MCP-1 A/A (A/A)	–	–	NH	–
OAS-3 C/C (C/C)	–	–	NH	–

Bold means alterations in tests

*MCP-1* monocyte chemoattractant protein 1, *M* mutated, non-functional, *NH* normal homozygote, *OAS-3* 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, *SARS-CoV-2* severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, *SNP* single nucleotide polymorphism, *RSV* respiratory syncytial virus, *TIRAP* toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein, *TLR-3* toll like receptor 3, *TLR-7* toll like receptor 7, *VDRL* Venereal Disease Research Laboratory, *P* positive, *N* negative, *NR* non-reactive, – not done

with the reference sequences from GenBank in the software Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems), and novoSNP (Department of Molecular Genetics—VIB and University of Antwerp).

No base change was detected on rs3775291 (*tlr-3*), rs8177374 (*TIRAP*), rs1024611 (*mcp-1*), and rs61942233 (*oas-3*), being a normal homozygote for these genes. A base change (A > T) was detected on rs179008 (*tlr-7*)

SNP, being a mutated SNP, which causes an amino acid change (Q to L).

The procedures were in accord with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation from Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz [CAAE 37207920.6.0000.5091] and with the Helsinki Declaration (1964, amended most recently in 2008) of the World Medical Association and the patient's responsible written consent was obtained.

## Discussion

At the beginning of the Covid-19 pandemic, few infections and severe cases in young adults and almost none in children were reported [1]. On February 8, 2021, Lachassinne et al. reported that the incidence of SARS-CoV-2 infection in children was still low [10]. We wondered why some of the children could be infected and developed a severe Covid-19. Liu and Hill [5] reported that primary immunodeficient patients could be more susceptible to severe infections, posing a high risk to Covid-19. Deficiency in antiviral innate immune signaling (TLRs, TIRAP) [5] or chemokines (MCP-1) essential to call the appropriated immune defense cells or in interferon-induced molecules (OAS-3) would be some targets to find the answer to this question. Initially, we addressed our efforts to verify if there were non-synonymous SNPs in DNA that codify these proteins, using the blood of children who needed to be admitted to the hospital.

Although Covid-19 involves mainly the respiratory tract, there are some representative numbers of articles in the literature showing that several organs, including the liver and gastrointestinal tract, are also affected by SARS-CoV-2 [2–4].

Here we reported hepatitis, with gastrointestinal symptoms and fever in a 5-year-old male child, who was negative for hepatitis A, B, C, E, cytomegalovirus, Epstein Barr, syphilis, HIV, herpes, influenza, and respiratory syncytial virus. Additionally, the boy was positive for SARS-CoV-2 IgM, IgA, and IgG and presented one rs179008 in *tlr-7*. However, although immune tests were positive against SARS-CoV-2, a nasal swab collected 6 days after initial symptoms was RTq-PCR negative. Lack of detection of viral RNA 6 days after the first symptoms could be due to partial elimination of the virus confirmed by the presence of antibodies, or even the collection having been made traditionally only in the nasopharynx and oropharynx, since the child had no respiratory manifestations. Wang et al. 2021 [11] tested different clinical samples and detected SARS-CoV-2 in blood and feces. Kucirka et al. 2020 [12] also raised the question about the predictive value of the RTqPCR, which varies with time from exposure and symptom onset, predicting a reduction of 67% in the positivity on the fourth day.

Hepatitis provoked by SARS-CoV-2 could be associated with the impaired innate immunity against the virus caused by the polymorphism in *tlr-7* rs179008. The same SNP was reported by Fakhir et al. as being one of the causes of the impaired immune response during HCV infection [9]. Azar et al. (2020) reported patients infected with HIV-1, which presented the rs179008, produced lower quantities of TLR-7, resulting in lower production of IFN-1, with consequent higher viral load [13].

## Conclusions

To our knowledge, this is the first report of a SARS-CoV-2 caused hepatitis in a male child that has the rs179008 *tlr-7*, which could impair an efficient initial immune response. The knowledge of the patient's immune deficiency could improve the treatment to correct this deficiency with specific medications.

## Abbreviations

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; OAS-3: 2'5'-Oligoadenylate synthase-3; PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns; PRR: Pattern recognition receptor; SNP: Single nucleotide polymorphism; TLR: Toll-like receptor; Tirap: Tir domain-containing adaptor protein.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the work and contribution of all the health providers from Hospital João Paulo II, PHEMIG, and the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

## Authors' contributions

NLP, AAB, EGK, PAA, and MAC conceived and designed the experiments. NLP, TBSS, EVSR, and TAR performed the experiments. NLP, AAB, ALC, EGK, and MAC analyzed the data. MAC and EGK contributed reagents, materials, and analysis tools. AAB and ALC, did attendance and medical assistance to and blood collecting from the children. NLP, AAB, EGK, and MAC wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This work was supported by Beatriz Cerqueira-MG individual state deputy parliamentary amendment through Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, health insurance [2071001135/2020] and by PPSUS [APQ-00846-20] from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; EGK and MAC are fellow from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## Availability of data and materials

All data and information are available without restriction and included in the manuscript.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

This project was approved by the Ethical Committee of Institute René Rachou, FioCruz, CAAE 37207920.6.0000.5091. The patient's responsible written permission was obtained.

### Consent for publication

The patient's responsible written permission was obtained.

### Competing interests

TAR declares competing interests. She received a salary from Quibasa Química Básica (producer of immunological test kits, address Rua Teles Menezes 92, 31565-130 Belo Horizonte, MG, Brazil) (<https://br.linkedin.com/company/quibasa-quimica-basica>).

### Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>2</sup>Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>3</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>4</sup>Hospital João Paulo II, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>5</sup>Quibasa Química Básica, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Received: 25 March 2021 Accepted: 23 August 2021

Published online: 05 September 2021

### References

- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395:497–506.
- Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:428–30.
- Xu L, Liu J, Lu M, Yang D, Zheng X. Liver injury during highly pathogenic human coronavirus infections. *Liver Int*. 2020;40:998–1004.
- Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA*. 2020;324:782–93.
- Liu BM, Hill HR. Role of host immune and inflammatory responses in COVID-19. Cases with underlying primary immunodeficiency: a review. *J Interferon Cytokine Res*. 2020;40:549–54.
- Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7:131–7.
- Mukherjee S, Huda S, Babu SPS. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review. *Scand J Immunol*. 2019;90:e12771.
- van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, et al. Presence of genetic variants among young men with severe COVID-19. *JAMA*. 2020;324:663–73.
- Fakhir FZ, Lkhider M, Badre W, Alaoui R, Meurs EF, Pineau P, et al. Genetic variations in toll-like receptors 7 and 8 modulate natural hepatitis C outcomes and liver disease progression. *Liver Int*. 2017;38:432–42.
- Lachassinne E, de Pontual L, Caseris M, Lorrot M, Guilluy C, Naud A, et al. SARS-CoV-2 transmission among children and staff in daycare centers during a nationwide lockdown in France: a cross-sectional, multicenter, seroprevalence study. *Lancet Child Adolesc Health*. 2021;S2352–4642(21):00024–9.
- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*. 2020;323:1843–4.
- Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction-based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *J Ann Intern Med*. 2020;173:262–7.
- Azar P, Mejia JE, Cenac C, Shaiykova A, Youness A, Laffont S, et al. TLR7 dosage polymorphism shapes interferogenesis and HIV-1 acute viremia in women. *JCI Insight*. 2020;5:e136047. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.136047>.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## CASE REPORT

## Children with sickle cell disease and severe COVID-19 presenting single nucleotide polymorphisms in innate immune response genes – A case report

Natália Lima Pessoa<sup>1,2</sup> | Lilian Martins Oliveira Diniz<sup>3,4</sup> | Adriana de Souza Andrade<sup>2</sup> |  
Erna Geessien Kroon<sup>1</sup> | Aline Almeida Bentes<sup>3,4,#</sup> | Marco Antônio Campos<sup>2,#</sup> 

<sup>1</sup> Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup> Hospital João Paulo II, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

### Correspondence

Marco Antônio Campos, Imunologia de Doenças Virais, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil.  
Email: marco.campos@fiocruz.br  
Aline Almeida Bentes, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.  
Email: alinebentes2000@gmail.com

#These authors contributed equally to this work.

### Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, health insurance, Grant/Award Number: 2071001135/2020; PPSUS, Grant/Award Number: APQ-00846-20

### Abstract

Here we report three clinical cases of children with sickle cell disease (SCD) and severe COVID-19 who evolved with complications during hospitalization or after discharge. They present single nucleotide polymorphisms in *tlr-7* and *tirap* genes, identified from 37 patients under 16 years old hospitalized from September 2020 to May 2021 in the Hospital João Paulo II, Belo Horizonte, Brazil. They presented significant complications of SCD as acute chest syndrome, splenic sequestration, and pain crisis during hospitalization or up to 2 months after SARS-CoV-2 infection. They all required transfusion of concentrated red blood cells and hospitalization in a reference hospital to care for children with SCD.

### KEYWORDS

case report, COVID-19, innate immunity, sickle cell disease, single nucleotide polymorphisms, TIRAP, TLR-7

Sickle cell disease (SCD) is a clinical expression of homozygosity for hemoglobin S characterized by chronic hemolytic anemia. Worldwide it is estimated that 3.2 million people are living with SCD. SCD patients may develop acute chest syndrome, pulmonary embolism, and stroke [1]. The innate immune system is activated in SCD with a high expression of toll-like receptor 4 (TLR-4) [2], which depends on Tir domain-containing adaptor protein to be functional. Additionally, there is an involvement of innate immune cells, including monocytes, neutrophils, platelets, and mast cells, promoting inflammation, adhesion, and pain [3].

SARS-CoV-2 is a single-stranded RNA betacoronavirus responsible for the COVID-19 pandemic. Studies in children infected with SARS-CoV-2 in developed countries have detected low mortality. However, a recent study found that children and adolescents who had a previous disease, such as SCD, had a 2.96 risk of evolving to death [4].

The host's innate immune system is responsible for protecting against microorganisms [5,6], including viruses [7–9], and there is a recognition of pathogen-associated molecular patterns through their pattern recognition receptors [5–10]. TLR-7 is a pattern recognition

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *eJHaem* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

**TABLE 1** Laboratory results, SARS-CoV-2 test, and single nucleotide polymorphism genotype and phenotype

Tests (units) demographic/patient	1	2	3	Reference range
Age (years, months)	15	1,5	6	-
Sex	Feminine	Masculine	Feminine	-
Oxygen saturation at hospital admission	90%	98%	80%	94%-100%
Clinical manifestation	Acute chest syndrome	Flu syndrome	Viral pneumonia	-
Chest tomography	Diffuse interstitial infiltrate. Bronchial-vascular cluster at the base of the right lung.	Not performed	Interstitial infiltrate of the posterior and inferior segment of the right hemithorax; bilateral bronchial thickening.	-
qRT SARS-CoV-2	P	P	P	N
SARS-CoV-2 Antigen	ND	ND	P	N
Hemoglobin (g/fdl)	6.3	7.7	5.5	11.5-13.5
Reticulocytes (%)	0.1	7.8	14.2	1-1.5
Leukocytes (cells × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	11.8	3.9	21.9	5-14.5
Neutrophil (cells × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	7.0	1.5	16.4	1.5-8.0
Lymphocyte (cells × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3.2	2.2	2.8	1.5-6.5
Platelets (cells/mm <sup>3</sup> × 10 <sup>3</sup> )	418	87	195	150-400
C-reactive protein (mg/L)	49.6	6.0	85.9	<12
Blood culture	N	N	N	N
TLR-7 T/T (A/A)	HT	NH	NH	-
TIRAP C/C (T/T)	NH	HT	HT	-

Abbreviations: HT, heterozygote; N, negative; ND, not done; NH, normal homozygote; P, positive; TIRAP, toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein; TLR-7, toll-like receptor 7.

receptor that recognizes single-stranded RNA [10]. Most TLR signaling initiates with the activation of adaptor protein MyD88, which is recruited to the Tir domain present in the cytosolic tail of all TLRs. In response to natural activators of innate immunity, the sorting adaptor Tir domain-containing adaptor protein regulates TLR signaling from the plasma membrane and endosomes [11]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in innate immune system genes can negatively influence the immune response to infectious diseases [12], as exemplified by rs179008 (*tlr-7*) [12] and rs8177374 (*tirap*) [13]. Chromosomal X *tlr-7* loss-of-function variants were identified in four young men with severe COVID-19 [14].

Here we report three clinical cases of children with SCD and severe COVID-19 who evolved with complications during hospitalization or after discharge (Table 1). These patients with SCD, SARS-CoV-2 positive, with SNPs present in *tlr-7* and *tirap* genes, were identified over 9 months (from September 2020 to May 2021) in the Hospital João Paulo II, Belo Horizonte, Brazil, from 37 cases of severe COVID-19 studied.

The identified SNPs rs179008 in the *tlr-7* gene and rs8177374 in the *tirap* gene were tested using the methods described before [15]. A base change (A > T) was detected on rs179008 (*tlr-7*) SNP, causing an amino acid alteration (Q to L), and additionally, there was a base alteration (C > T) with a change of S to L in SNP rs8177374 (*tirap*).

The procedures were in accord with the Committee on Human Experimentation from Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz [CAAE 37207920.6.0000.5091] and with the Helsinki Declaration (1964, amended most recently in 2008) of the World Medical Association and the patient's responsible written consent was obtained.

The first patient, a 15-year-old female, was admitted to the hospital with acute chest syndrome 1 week after the onset of SARS-CoV-2 symptoms. She had severe pain in the sternum and bilateral chest, ventilatory dependent. Nasal cannula oxygen therapy 2l/min for 8 days, morphine for pain control for 5 days was required. She was medicated with antibiotics for 10 days, with 40 mg/day enoxaparin and inhaled salbutamol throughout her hospital stay. On the third day of

hospitalization, a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) for SARS-CoV-2 from the collected nasopharyngeal swab was positive. On the fifth day of hospitalization, she evolved with significant pallor associated with splenomegaly (palpable spleen 6 cm from the right costal margin). A total blood count showed a drop in hemoglobin from 8.5 to 6.3 mg/dl, with no reticulocyte increase (0.1%). She received red blood cell transfusions, with gradual improvement, and oxygen therapy was discontinued 3 days later. She was discharged after 11 days of hospitalization. The SNP rs179008 in the *tlr-7* gene was identified in this patient.

The second patient, a child aged 1 year and 5 months, was admitted to the hospital after 3 days of coughing, fever, and sore throat. He evolved with diarrhea and pallor, with a drop in hemoglobin from 8.5 to 7.7 mg/dl. A nasopharyngeal swab for SARS-CoV-2 was collected on the fourth day of the onset of symptoms which qRT-PCR was positive. He was discharged after 3 days. However, 2 months later, he was admitted to the intensive care unit in another hospital due to splenic sequestration and received a blood transfusion. The SNP rs8177374 in the *tirap* gene was identified in this patient.

The third patient, a 6-year-old child, was admitted to the hospital one day after the onset of symptoms as cough, fever, and dyspnea. She was admitted to the emergency room due to tachypnea and oxygen saturation of 80%, and oxygen was administered through a non-rebreathing mask. Chest tomography showed an image of interstitial involvement in the posterior and inferior segment of the right thorax and bilateral bronchial thickening. A nasopharyngeal swab for SARS-CoV-2 antigen was collected on the first day of the onset of symptoms, and qRT-PCR was positive. Two days after discharge, she returned to the hospital with an intense pain crisis associated with oliguria, decreased oxygen saturation, and fever. Intravenous hydration, fixed morphine, ceftriaxone, and oxygen through nasal cannula were prescribed. Three days later, she developed paleness and a drop in hemoglobin from 7.5 to 5.5 mg/dl. She received a red blood cell transfusion with progressive improvement, being discharged after a week with reasonable pain control. The SNP rs8177374 in the *tirap* gene was identified in this patient.

The children reported here presented significant complications of SCD as acute chest syndrome, splenic sequestration, and pain crisis during hospitalization or up to 2 months after SARS-CoV-2 infection. They all required transfusion of concentrated red blood cells and hospitalization in a reference hospital to care for children with SCD. We studied 37 cases of severe COVID-19, with three SCD patients, corresponding to 8.1% of all studied cases. All the SCD patients present SNPs, which draws our attention, why we wrote this report. We want to stimulate further studies to draw attention to the possible impact in children with SCD, COVID-19, and SNPs in the TLR pathway.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Beatriz Cerqueira-MG individual state deputy parliamentary amendment through Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, health insurance [2071001135/2020] and by PPSUS [APQ-00846-20] from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; EGK, and MAC

are fellow from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities. The authors have no competing interests.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

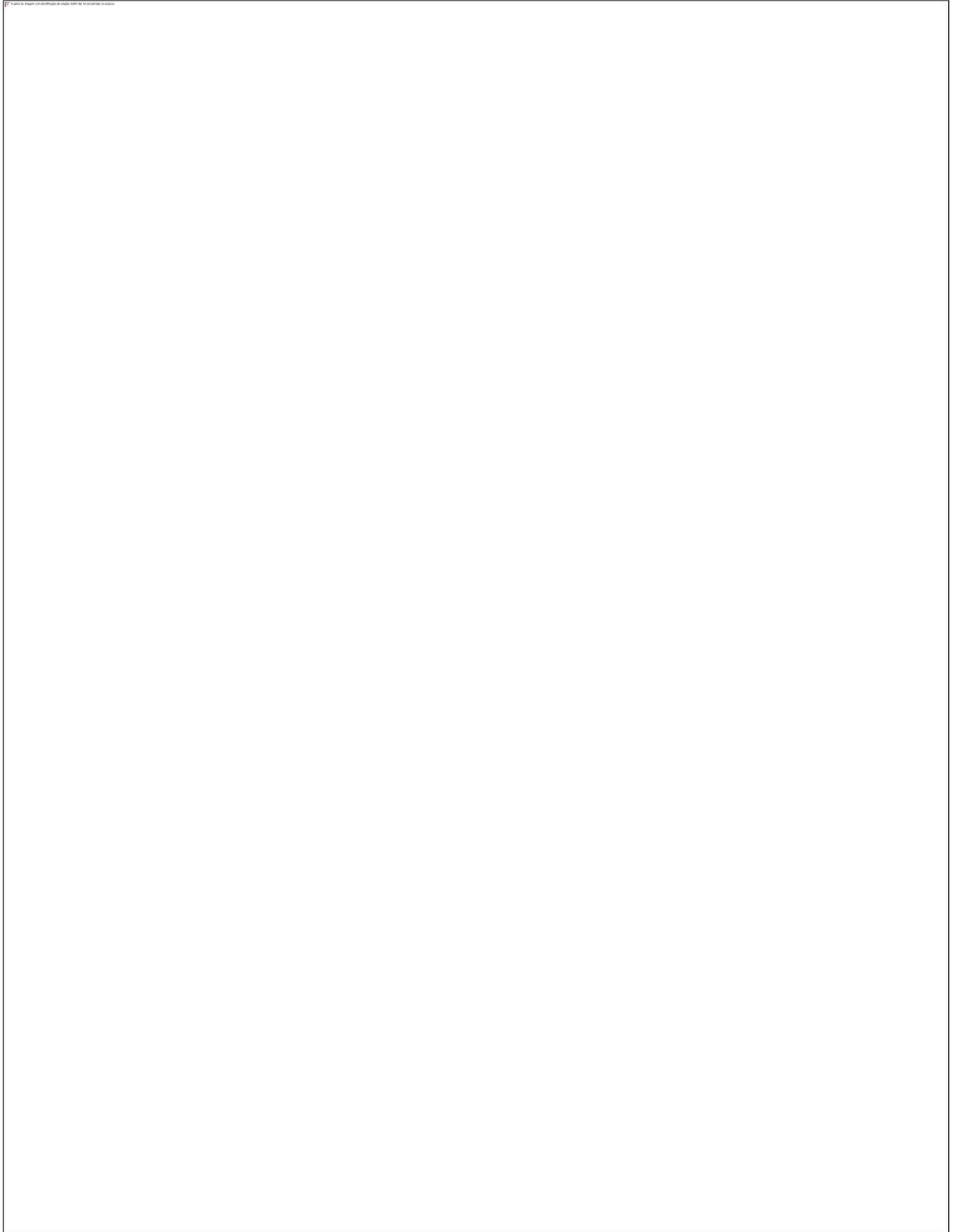
Natália Lima Pessoa, Aline Almeida Bentes, Erna Geessien Kroon, and Marco Antônio Campos conceived and designed the experiments. Natália Lima Pessoa performed the experiments. Natália Lima Pessoa, Adriana de Souza Andrade, Erna Geessien Kroon, Aline Almeida Bentes, and Marco Antônio Campos analyzed the data. Marco Antônio Campos and Erna Geessien Kroon contributed reagents, materials, and analysis tools. Aline Almeida Bentes and Lilian Martins Oliveira Diniz did attendance and medical assistance to and blood collecting from the children. Natália Lima Pessoa, Adriana de Souza Andrade, Erna Geessien Kroon, Aline Almeida Bentes, and Marco Antônio Campos wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

#### ORCID

Marco Antônio Campos  <https://orcid.org/0000-0003-4683-0176>

#### REFERENCES

- Sundt P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:263–92
- Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18010. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>
- Allali S, Maciel TT, Hermine O, de Montalembert M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica* 2020;105(2):273–83.
- Oliveira EA, Colosimo EA, Simões E, Silva AC, Mak RH, Martelli DB, et al. Clinical characteristics and risk factors for death among hospitalised children and adolescents with COVID-19 in Brazil: an analysis of a nationwide database. *Lancet Child Adolesc Health*. 2021;5(8):559–68.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Paganini E, Procopio DO, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. 2001;167:416–423.
- Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/Interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev*. 2004;201:9–25.
- Mansur DS, Kroon EG, Nogueira M, Arantes RME, Rodrigues SCO, Akira 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.
- Lima GK, Zolini 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*. 2010;177:2433–45.
- Zolini GP, Lima GK, Lucinda N, Silva MG, Dias MF, Pessoa NL, et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *J Neuroinflammation*. 2014;11:20.
- Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7:131–7.
- Bonham KS, Orzalli MH, Hayashi K, Wolf AI, Glanemann C, Wening W, et al. A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell* 2014;156(4):705–16.



## Subcutaneous Model for the Study of Dengue Virus Infection in Immune Competent Mice

Beatriz Senra Santos<sup>1</sup>, Natalia Lima Pessoa<sup>1,2</sup>, Natalia Lucinda<sup>1,3</sup>, Gustavo Cardoso de Oliveira<sup>1</sup>, Thais Souza Silva<sup>1</sup>, Ketyllen Reis Andrade<sup>1</sup>, Bruno Galvão Filho<sup>1</sup>, Marcelle Neves Rocha<sup>1</sup>, Alexandre Vieira Machado<sup>1</sup>, Pedro Augusto Alves<sup>1</sup>, Érica Alessandra Rocha Alves<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>2\*</sup>, Marco Antônio Campos<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup>Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Laboratório de Virologia, Brasília, Brazil

Email: \*marcoasc@minas.fiocruz.br

**How to cite this paper:** Santos, B.S., Pessoa, N.L., Lucinda, N., de Oliveira, G.C., Silva, T.S., Andrade, K.R., Filho, B.G., Rocha, M.N., Machado, A.V., Alves, P.A., Alves, É.A.R., Kroon, E.G. and Campos, M.A. (2018) Subcutaneous Model for the Study of Dengue Virus Infection in Immune Competent Mice. *Journal of Biosciences and Medicines*, 6, 97-110.  
<https://doi.org/10.4236/jbm.2018.65011>

**Received:** March 31, 2018

**Accepted:** May 21, 2018

**Published:** May 24, 2018

Copyright © 2018 by authors and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



### Abstract

Various mouse models to study dengue have been described by different authors, some of them using immunodeficient or some using humanized mice. Our group reported previously a deadly murine model, which used the intracranial inoculum of highly virulent Dengue virus (DENV) in immune competent mouse. Here we present a model of immune competent mouse (C57BL/6), infected subcutaneously by the same highly virulent DENV (DENV3 genotype I). In this immunocompetent systemic mice model, the cytokine levels and hematological parameters such as total and differential leukocyte and platelets counts, together with weight loss, were considered important monitoring parameters, allowing a better understanding of the systemic human disease. Mice were inoculated subcutaneously and evaluated by the percentage weight variation as well as the clinical signs. Hematological parameters and cytokines levels were measured and viral titration in brain tissue or serum neutralization was performed to confirm mice infection. The subcutaneously DENV inoculated mice showed weight loss after infection, but they did not show any other clinical signs. The leukocytes and platelets decreased after subcutaneous inoculation. The cytokines TNF alpha and IFN gamma increased after infection in mice. The subcutaneous model provided scope for improved understanding of the dengue pathogenesis, as well as possible mechanism for protection to subsequent mouse infected by intracranial route in mice. This model could be used to study the vertebrate immune response and evaluation of drugs or vaccine against dengue virus.

\*These authors contributed equally to this work.

---

## Keywords

Subcutaneous Murine Model, Dengue Disease, Immune Competent Mouse, Cytokines, Innate Immune Response

---

## 1. Introduction

Dengue, one of the most prevalent infectious diseases in the 21<sup>st</sup> century [1], is a mosquito-borne viral disease. Dengue is a febrile disease of acute evolution caused by the dengue virus (DENV) of the *Flaviviridae* family, and it infects humans through the bite of the female hematophagous mosquito *Aedes aegypti* [2]. Patients often develop a sudden high fever after the incubation period. This acute febrile phase usually lasts 2 - 7 days and is often accompanied by several symptoms, such as headaches, chills, retro-orbital pain, and myalgia. Dengue was classified by the World Health Organization as occurring with or without warning signs or as severe dengue [3] [4].

One of the possible warning signs is the impairing of consciousness (neurological disease) caused by DENV, which may include symptoms such as severe headache, neck stiffness, reduced consciousness and seizures. Although not very common to date, neurological disease caused by DENV is more frequently described in the last years and is a severe disease. However, the cause of this neurovirulence is still unclear [5] [6] [7] [8] [9]. In animal model, the uses of hematological parameters such as differentiation and counting of total leukocytes, red blood cells, platelets, lymphocytes, neutrophils and monocytes [10] [11] [12] [13] are important disease markers, allowing a better understanding of dengue disease and its response mechanisms in the body of the animals studied [5] [14] [15] [16] [17]. Additionally, cytokines such as IFN gamma, TNF alpha and IL12p70 are used to evaluate the immune response to DENV infection [18] [19] [20].

Three different approaches are found in the literature, focusing on the induction of a human-like disease in any of: 1) immunocompetent mice [6], 2) mice deficient in specific genes that are important for the immune response and are naturally absent or have been removed [17] [21] [22], and 3) immunodeficient mice that had been implanted with human cells [6] [21] [22].

Our group reported previously an intracranial inoculum of a highly virulent DENV in immune competent mouse, causing death [6]. However, this model was very aggressive with the death of the mice in 9 days with neurological signs. Here we present a model of immune competent mouse (C57BL/6) infected subcutaneously mimicking the natural way of infection by the same highly virulent DENV (DENV3 genotype I) used previously [6] [21]. This allowed the understanding of some additional steps of the pathogenesis, and showed that the subcutaneous infection conferred protection to a second infection by an intracranial via.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Virus

DENV3 genotype I (MG20), which is highly virulent for mice, was obtained from virus collection of Laboratório de Vírus of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. It was isolated from a patient presenting neurological manifestations of dengue and death [23]. The virus used in this study was a virus with only 6 passages in C6/36 cells, thus maintaining the initial highly virulent characteristics of the virus.

### 2.2. Cells

C6/36 cells is a continuous lineage obtained from *Aedes albopictus* (ATCC, number CRL-1660) larvae and were cultivated on Leibovitz (L-15) medium (Gibco, USA), containing ciprofloxacin at 10 µg/mL and fetal bovine serum (FBS) at 10% (Cultilab, Brazil). Cells were maintained in BOD at 28°C. For the passage of cell monolayers, culture medium was discarded and cells washed with phosphate buffer saline (PBS), pH 7,2 and then homogenized in L15 medium (Gibco, USA) and distributed into 25 or 75 cm<sup>2</sup> culture flasks. C6/36 cells were used to study viral replication. BHK-21 cells derived from hamster kidney (ATCC, number CCL-10) were cultivated on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA), containing gentamicin at 50 µg/mL, penicillin at 100 IU/mL, amphotericin B at 5 µg/mL and FBS at 5%. Cells were maintained in a CO<sub>2</sub> cell incubator at 37°C. BHK cells were used in viral titration protocol and serum neutralization test.

### 2.3. Mice

Immune competent C57BL/6 mice were provided by animal facilities of Instituto René Rachou-Fiocruz-MG (IRR). The animals, all males, were 8 weeks old.

### 2.4. Animal Research

This project was submitted to and approved by the Ethical Committee of Animal Handling (CEUA) from Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brazil (LW-7/16), see annex 1. This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Brazilian National Council for Control of Animal Research (CONCEA).

### 2.5. Criteria Used to Determine Mice Euthanasia

In previous publication we demonstrated that mice inoculated by intracranial route with highly virulent virus presented clinical signs of disease as loss of weight, lethargy, ruffled fur, hunched posture and paralysis of paws, and since then it has been established by our group that the mice with these clinical signs should be immediately euthanized [6]. These criteria were described in the project submitted and approved by the Ethical Committee of Animal Handling described above.

Additionally the infected or mock mice were euthanized at the end of each experiment. No animal died before meeting the euthanasia criteria or before the end of the experiment.

## 2.6. Animal Welfare

Animals were maintained in micro isolators on ventilated shelves at IRR's animal facilities, where the temperature ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humidity, ventilation, sanitation and illumination were controlled. Food and water were provided *ad libitum*. Mice received subcutaneous inoculum (SC) containing  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV 3 genotype I (MG20) on a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . The animals were monitored daily for evaluation of clinical signs and survival curve and weighed daily. All cages had igloos as environmental enrichment for animals. All those involved in the handling of the animals were previously trained by the IRR's animal facilities.

## 2.7. Models of Infection

Subcutaneous infection (SC)—the mice received inoculum of  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV by SC route (inoculum of 100  $\mu\text{L}$ ); Intracranial infection (IC)—the mice received inoculum of 400 p.f.u. of DENV by IC route (inoculum of 10  $\mu\text{L}$ ); Subcutaneous infection followed by intracranial infection (SC-IC)—the mice received  $5 \times 10^4$  p.f.u. of virus (inoculum of 100  $\mu\text{L}$ ) and after 14 days received new infection by IC route with 400 p.f.u. of virus (inoculum of 10  $\mu\text{L}$ ); Mock mice—the mice received only inoculum with the C6/36 cell supernatant. Six mice were used in each group.

## 2.8. Viral Titration

BHK-21 cells were used to titer viral stocks and the organs of infected mice. Cell monolayer,  $5 \times 10^5$  BHK-21 cells were implanted in 6 wells plates with DMEM supplemented with 5% of heat inactivated FBS (Cultilab, Brazil) and antibiotics, and incubated for 24 hours at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  cell incubator. Medium was discarded and cell monolayer was washed once with PBS. Then 400  $\mu\text{L}$  of serial dilutions (using  $10^{-3}$  to  $10^{-7}$  dilutions) of virus to be titrated were added in each well, leaving a well for cell control. After one hour of adsorption the medium was removed and 2 mL/well of DMEM, containing 1% of carboxymethylcellulose (CMC) (Sigma, Germany) and 2% of FBS was added. Cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 6 days at a cell incubator with 5% of  $\text{CO}_2$ . After 6 days of observation under a microscope, cells were fixed for 1 hour with formaldehyde at 3.7% diluted in PBS for subsequent staining with crystal violet at 1% solution for 20 minutes. The number of lysed plaques were counted for titer determination in plaque forming units per milliliter (p.f.u./mL).

## 2.9. Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT<sub>50</sub>) for DENV-3

The adapted protocol from Russell *et al.* [24] was used for serum neutralization

test. BHK-21 cells were plated at the concentration of  $5 \times 10^4$  cells/ml in 24 well plate (1 mL/well) with DMEM supplemented with 5% of FBS and antibiotics and incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> cell incubator. Sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and diluted (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) in DMEM supplemented with 1% FBS and incubated with the same volume of diluted virus (50 p.f.u./well) for 1 hour at room temperature. The neutralized sera were added to BHK-21 cells in plates for one hour for adsorption. The serum was removed and 1 mL DMEM supplemented with 5% of FBS and 1% CMC was added in each well and was incubated at 37°C for 7 days in a 5% CO<sub>2</sub> cell incubator. After seven days the cells were fixed for one hour with 3.7% formaldehyde diluted in PBS and subsequently stained with crystal violet (1%) for 20 minutes. Plaques were counted in wells that received negative serum and, in the wells, which received the test sera. The PRNT<sub>50</sub> index was calculated by the highest serum dilution capable of reducing the total number of plaques by 50%, relative to the control.

### 2.10. Cytokine Level Detection

To measure the cytokine levels in brain tissues were collected, macerated and stored on a protease inhibitor solution (complete, Mini, EDTA-free) and 25 µL/well of organ macerate or 25 µL of each dilution of standard (including the negative control) were added into a 96 well V-bottom plate. Following, 18 µL/well of the CBA mix (Inflammation BDTM Cytometric Bead Array (CBA) mouse kit [25], USA) was pipetted. Then, 15 µL of PE detection reagent was added and it was incubated for 2 hours protected from light. After the incubation period, 100 µL of wash buffer was added to each well and centrifuged at 200 g for 5 minutes. Supernatant was discarded and 150 µL/well of wash buffer was added to wash the beads. Samples were read in the FACSCan (BD Biosciences) and the analysis of the CBA was done in the CellQuest software (BD Biosciences), with the results represented in pg/mL. The cytokine kinetics was chosen based on innate (6 and 12 h.p.i. hours post infection) and adaptive immune response (8 d.p.i. days post infection) in the host [19] and on the time at which the weight loss begins.

### 2.11. Real-Time PCR

Real-Time PCR was performed to measure levels of virus genomic RNA expression in brain and liver [26] [27]. RNA extracted with TRIzol<sup>®</sup> reagent was treated with DNase prior to further reverse transcription. Protocol of RNA treatment with DNase was according to the RQ1 RNase-Free DNase kit instructions (Promega). Procedure for reverse transcription (RT) was performed according to the protocol of the manufacturer (Promega Corporation, USA). For the qPCR, 2.5 µL of the cDNA obtained from the RT were used. Each primer (0.2 µL) was aliquoted at 10 µM; 5.0 µL of Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems) and 2.0 µL of RNase-free water (Ultra-Pure Distilled Water-Invitrogen) with a final volume of 10.0 µL/well was used in a 384 wells plate

containing SYBR Green I marker, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (2 units for reaction), dNTP, buffer and passive reference dyestuff ROX, in Applied Biosystems ViiA™ 7 apparatus. Amplifications were used with 40 cycles of 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 minute, preceded by 95°C for 3 minutes. After the reaction, the amplified specificity was observed, conferring the dissociation temperature (TM) given by the dissociation curve, specific for the target transcript. The following oligonucleotides were used in the reactions: HPRT—hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Reverse: 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG-3'; Forward: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3'); DENV-5' URT DENV Non-coding 5' terminal region of the DENV: (Reverse: 5'-TCC GTT GGT TGT TCA TCA GA-3'; Forward: 5'-TCG GAA GCT TGC TTA ACG TAG-3'). Relative quantification methodology was used to analyze the data. Expression of the genomic RNA was normalized to the expression level of the constitutively expressed HPRT gene.

### 2.12. Blood Cells Count

Immediately after anesthesia, blood samples were obtained through brachial plexus and were added on microtainer tubes coated with EDTA (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA). Red blood cells (diluted in PBS 1:200), platelets (diluted in ammonium oxalate 1:100) and leukocytes (diluted in Turk's blue solution 1:20) counts were performed manually on a Neubauer chamber and monocytes, neutrophils and lymphocytes were counted manually on a previously fixed and stained blood smear slide.

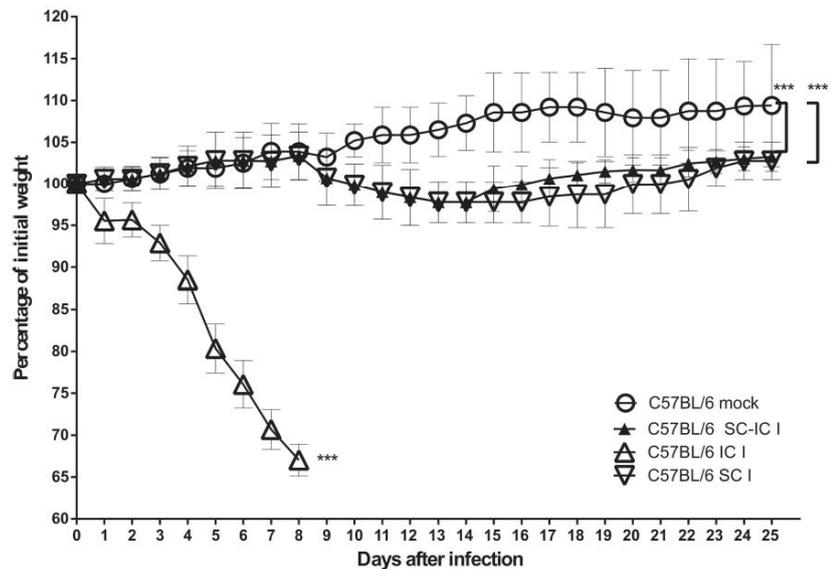
### 2.13. Statistical Analysis

The infected groups were compared to the control group using the Mann-Whitney test for non-parametric samples and T-test for parametric samples. Statistical analyzes were performed utilizing the statistical software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Impact on Weight after Inoculation of DENV3 Genotype I, By Subcutaneous (SC) Route and Protection to a Second Challenge by Intracranial (IC) Route of Infection in Immune Competent Mice

The C57BL/6 mice were inoculated via intracranial (IC) route with  $4 \times 10^2$  p.f.u. of DENV 3 genotype I (Figure 1). Clinical signs (weight loss, pilo-erection, hunched posture and hind limb paralysis) were evaluated daily, confirming the susceptibility to neuro-infection of mice by via intracranial (IC) route which developed neuro-encephalitis and death within 9 days after infection, as reported previously [6]. In another model, the same highly virulent DENV and the same strain of mice used in previous studies but inoculated subcutaneously (SC)



**Figure 1.** Impact on weight of immune competent mice (C57BL/6) after subcutaneous inoculum of highly virulent DENV. Four groups of mice were used in this experiment: mock mice, subcutaneously infected mice (C57BL/6 SC I), subcutaneously-intracranially infected mice (C57BL/6 SC-IC I), and mice infected by IC route (C57BL/6 IC I), to compare the impact on the survival of both types of inoculums. \*\*\* $p < 0.0001$  when compared C57BL/6 mock  $\times$  C57BL/6 SC I, C57BL/6 mock  $\times$  C57BL/6 SC-IC on days 15 - 23 after infection and C57BL/6 mock  $\times$  C57BL/6 IC on days 4 - 8 after infection using t test. d.p.i. = days post infection. Figure representative of three experiments with similar results.

instead IC. This subcutaneously (SC) infection was performed with  $5 \times 10^4$  p.f.u. and the mice were evaluated daily for the appearance of clinical signs of the disease during the next 25 days (Figure 1).

The infected mice presented a percentage variation of weight gain lower than the uninfected ones. In this model of infection, the animals did not show pilo-erection, hunched posture or hind limb paralysis, and no mouse died, but there was weight loss in infected mice compared to uninfected mice. The infected mice presented this weight loss from day 10 post infection and regained weight from day 18 after infection, maintaining that gain until the end of the experiment.

Firstly, a SC infection was performed with  $5 \times 10^4$  p.f.u. and on day 14 after this infection, a second infection, now via IC, was performed with  $4 \times 10^2$  p.f.u. of highly virulent DENV. The variation of weight gain between the infected and the non-infected mice were similar to that in the SC infection and mock SC only. The mock curve was performed with mean of the weights of the mice inoculated separately with C6/36 cell supernatants by the three routes (SC, IC and SC-IC), because the weights were very similar.

To confirm virus effective infection via IC, SC and SC-IC, virus brain titration, with inoculum via IC or via SC or via SC-IC or serum neutralization via inoculum SC, of infected mice, were performed (Table 1) and also Real Time PCR was performed to confirm the presence of genomic RNA in the brain (infected via IC or SC-IC) or in the liver of the animals infected by SC (Figure 2).

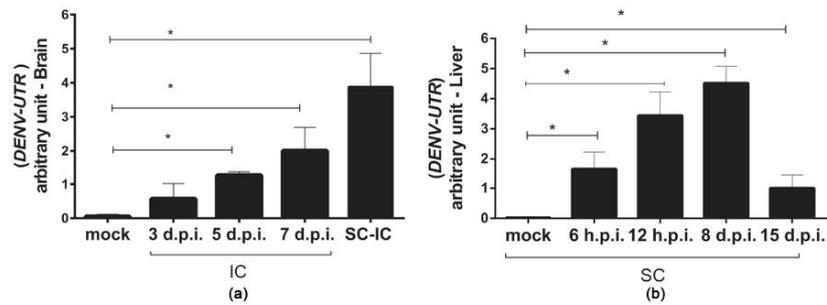
The results confirm that the virus replicated inside the brain in the IC or SC-IC or in the serum via SC infection with a titer of  $1.2$  to  $1.4 \times 10^4$  p.f.u. at the 5<sup>th</sup> day post infection and  $29 \times 10^4$  p.f.u. at the seventh day post infection (Table 1). There was an antibody response against DENV in the SC infection at a titer of 1:80 per mL at the 60<sup>th</sup> day post infection (Table 1).

**3.2. Changes in Hematological Parameters**

Leukopenia was observed in subcutaneously infected mice on the 8<sup>th</sup> day after infection when compared to uninfected animals (Figure 3(a)). There was no significant difference in erythrocytes counts in mice (Figure 3(b)) in any of the times studied when compared to the uninfected ones. Figure 3(c) shows a decrease in the number of platelets at all times studied in the infected mice when compared to the uninfected mice.

**Table 1.** Viral titer and serum neutralization.

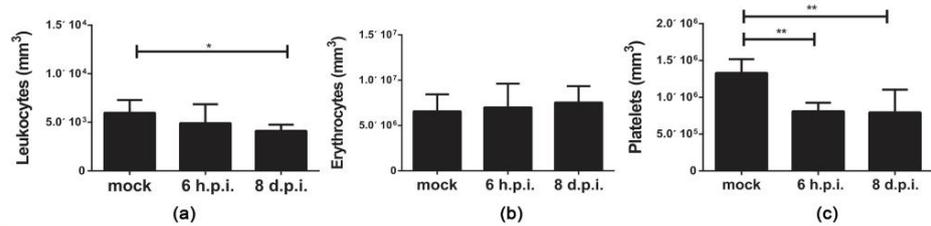
	Virus titer p.f.u. $\times 10^4$ (per mg of brain, IC)	Virus titer p.f.u. $\times 10^4$ (per mg of brain, SC-IC)	Virus titer p.f.u. $\times 10^4$ (per mg of serum, SC)	Abs neutralization (SC)
0 dpi	-	-	-	
3 dpi	-	-	-	0 dpi < 20
5 dpi	1.2 ( $\pm 0.19$ )	1.4 ( $\pm 0.19$ )	1.3 ( $\pm 0.19$ )	60 dpi $\geq$ 80
7 dpi	29 ( $\pm 1.7$ )	30 ( $\pm 1.7$ )	20 ( $\pm 2.5$ )	



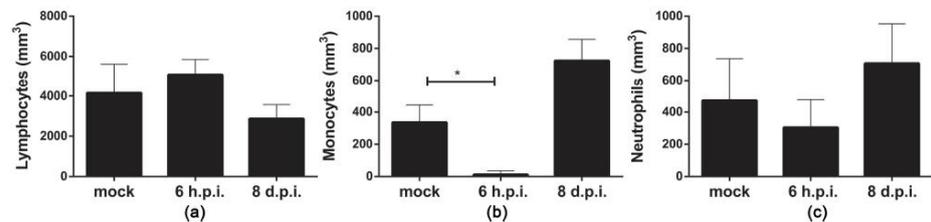
**Figure 2.** Detection of DENV mRNA level produced in C57BL/6 mice. (a) C57BL/6 mice were infected by intracranial route (IC), and euthanized at 3, 5 and 7 days after infection; or the C57BL/6 mice were infected via subcutaneous and after 14 days were infected again via intracranial and euthanized 7 days after the second infection (SC-IC). Mock animals received inoculum of C6/36 cell supernatant and after 14 days one more inoculum of C6/36 cell supernatant. (b) C57BL/6 mice were infected through via subcutaneous and euthanized at 6 (6 h.p.i.) or 12 hours (12 h.p.i.) or 8 (8 d.p.i.) or 15 days (15 d.p.i.) after infection. Mock animals received inoculum of C6/36 cell supernatant. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney non-parametric test. \*p < 0.05.

For virus titration in the brain after IC inoculation with 400 p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock), C57BL/6 mice were euthanized for removal of the brain on days 3, 5 and 7 post-infection. For the titration of the virus in the brain after SC-IC infection, C57BL/6 mice were inoculated via SC with  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock) and 14 days after this infection, the mice were inoculated again via IC with 400 p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock) and mice were euthanized for removal of the brain on days 3, 5 and 7 after this second inoculation. For virus titration in the serum, after inoculation via SC with  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock), the serum was collected 3, 5 and 7 days after inoculation. For the seroneutralization test (PRNT<sub>50</sub>), C57BL/6 mice were inoculated via SC with  $5 \times 10^4$  p.f.u. of virus or with C6/36 cell supernatant (mock) and serum samples were collected 60 days after inoculation. d.p.i. = days after infection.

There was no difference in lymphocytes counts in infected mice, when compared to noninfected mice (Figure 4(a)). A decrease in the monocytes count was observed 6 hours after infection in mice, when compared to non-infected mice (Figure 4(b)). In the infected mice there was no difference in the neutrophils count in comparison to the uninfected mice, at the times studied (Figure 4(c)).



**Figure 3.** Leukocytes, red blood cells and platelets count after DENV subcutaneously inoculation. Mice received subcutaneous inoculum of  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV, were euthanized 6 hours or 8 days after infection and blood were collected in EDTA tubes for leukocyte, red blood cells and platelets count. h.p.i. = hours post infection; d.p.i. = days post infection. Mock: mice received C6/36 cell supernatant inoculum. Statistical analyses were made with Mann-Whitney non-parametric test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . (a) mice leukocytes. (b) mice red blood cells. (c) mice platelets.



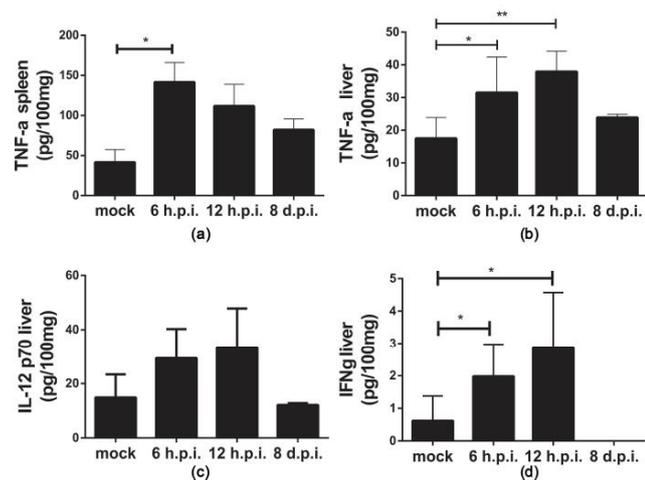
**Figure 4.** Lymphocytes, monocytes and neutrophils count after DENV infection. Mice received subcutaneous inoculum of  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV and were euthanized 6 hours or 8 days after infection and blood were collected in EDTA tubes for lymphocytes, monocytes and neutrophils count. h.p.i. = hours post infection; d.p.i. = days post infection. Mock: the mice received C6/36 cell supernatant inoculum. Statistical analyses were made with Mann-Whitney non-parametric test. \* $p < 0.05$ . (a) mice lymphocytes. (b) mice monocytes. (c) mice neutrophils.

### 3.3. Cytokine Levels Increase in the Liver and Spleen of Mice after Subcutaneous Infection

An increase of TNF alpha level in mice spleen, 6 hours after subcutaneous DENV inoculation was observed, when compared to the uninfected group (Figure 5(a)). An increase of TNF alpha level in mice liver was observed 6 and 12 hours after subcutaneous DENV infection, when compared to the uninfected group (Figure 5(b)). The cytokine IL-12p70 in the liver of infected mice was similar to cytokine level found in uninfected mice at all times studied (Figure 5(c)). On the other side, IFN gamma in the liver of mice 6 and 12 hours after infection with DENV was increased, when compared to the uninfected mice (Figure 5(d)). In the spleen no IL12-p70 and IFN gamma were detected (data not shown).

### 4. Discussion

Recently, our group presented an experimental model of intracranial (IC) infection with a highly virulent DENV, to study dengue disease with neurologic complications [5] [6]. Here, the intracranial inoculation performed in this work was to compare the weight loss observed with this kind of infection previously described [5] [6] with the weight loss obtained after the subcutaneous inoculation,



**Figure 5.** Cytokines levels on spleen and liver of mice, after DENV inoculum by subcutaneous route. Mice were inoculated via subcutaneous, with  $5 \times 10^4$  p.f.u. of DENV, euthanized with 6 or 12 hours or 8 days after infection and organs were collected and stored in a protease inhibitor solution. Cytokines were evaluated by flow cytometry beads. (a) TNF alpha levels on mice spleen. (b) TNF alpha levels on mice liver. (c) IL12 p70 on mice liver. (d) IFN gamma on mice liver. Mock: the mice received C6/36 cell supernatant inoculum). h.p.i: hours post infection; d.p.i: days post infection. Statistical analyses were made with Mann-Whitney non-parametric test. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

using the same mice sample and the same highly virulent virus. The subcutaneous inoculation is an additional model, using immune competent mice infected with highly virulent virus to study the immune response against dengue, looking for a less aggressive model, when compared to the intracranial inoculation model. The subcutaneous inoculation is also closer to how infections occur in humans, who are infected by mosquito's bites in the skin. While our model is not necessarily better than the humanized mice model, it is an additional model, which is less aggressive than the humanized mice model. And since a loss of weight and subsequent recovery and stabilization of the animals were observed in the subcutaneous infection, although no classic clinical signs occurred, we believed that this model could be useful for the study of dengue disease, for a better understanding of the pathogenesis of the disease. Differently from clinical signs, after SC infection of mice with DENV, hematological and immunological changes of the host were observed, what represents a way to study experimental dengue in mouse. Surprisingly, previous infection of mouse by SC conferred resistance to a subsequent IC infection (Figure 1). It seems that the subcutaneous infection prevents the mice from displaying an exacerbated immune response, resulting in the animal survival. The reason also could be that the antibody neutralization production, as presented in Table 1, could impair the lethality of this highly virulent DENV in the second infection by via IC. In our mouse experimental SC model, the mice suffer a thrombocytopenia (Figure 3(c)) and monocytopenia (Figure 4(b)) since the sixth hour after the infection, besides a leukopenia (Figure 3(a)) from day 8 after infection. Thrombocytopenia occurs in 80% to 100% of the dengue patients and leukopenia are a human dengue characteristic also [2] [3] [8] [9] [28] [29]. We showed in our model, that TNF alpha in the spleen and IFN gamma in the liver of immune competent mice 6 hours after infection with DENV have increased (Figure 5(a) and Figure 5(d), respectively), showing the importance of these cytokines to the host defense against a highly virulent dengue virus inoculated by via subcutaneous. It has been reported that the cytokines IFN gamma and TNF alpha are important in the fight against dengue [7] [30]. The model presented in this work presented some but not all of the human manifestations, as all the other models already mentioned in the literature, but it is an additional model, which uses immunocompetent mice, being infected by the subcutaneous via with a highly infective DENV. This model is an additional interesting model for the study of immune responses to dengue virus.

## 5. Conclusion

The study presents an immune competent mice model infected by via subcutaneous with highly virulent DENV. In this model, the cytokine levels and hematological parameters such as global and differential leukocyte and platelets counts, together with weight loss, were considered important parameters, allowing a better understanding of the disease, because these changes occur normally in human beings. Although there are other murine models for the study of

dengue, none of them shows all characteristics of human disease. Therefore, more than one model to cover several aspects of the disease is necessary. Our model proved to be an effective and less invasive option for studying the effects of highly virulent DENV on the immune response. This model could be used to study the vertebrate immune response, drugs or vaccine against dengue virus as it reproduces some of the clinical symptoms of patients.

### Acknowledgements

The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

### Fundings

The PAPES VI/Fiocruz/CNPq (403521/2008-4) to MAC; CNPq-MCTIC-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/FNDCT, Prevenção e Combate ao vírus Zika (440911/2016-8) to EGK; FAPEMIG-PPM (00452-17) to EGK; INCTV/FAPEMIG (000077-09) to MAC. AVM, EGK (307423/2015-8) and MAC (307285/2015) are fellows from CNPq.

### References

- [1] World Health Organization (WHO). (2016) Technical Handbook for Dengue Surveillance, Dengue Outbreak Prediction/Detection and Outbreak Response ("Model Contingency Plan"). World Health Organization, Geneva.
- [2] Xavier, A.R., Freitas, M.S., Loureiro, F.M., Borghi, D.P. and Kanaan, S. (2014) Manifestações clínicas na dengue: diagnóstico laboratorial. *Brazilian Journal of Medicine*, **102**, 7-14.
- [3] World Health Organization (WHO). (2012) Handbook for Clinical Management of Dengue. World Health Organization, Geneva.
- [4] World Health Organization (WHO). (2009) Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. World Health Organization, Geneva.
- [5] Ferreira, G.P., Figueiredo, L.B., Coelho, L.F.L., Junior, P.A.S., Cecilio, A.B., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., Arantes, R.M., Campos, M.A. and Kroon, E.G. (2010) Dengue Virus 3 Clinical Isolates Show Different Patterns of Virulence in Experimental Mice Infection. *Microbes and Infection*, **12**, 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.007>
- [6] Souza, K.P.R., Silva, E.G., Rocha, E.S., Figueiredo, L.B., Almeida-Leite, C.M., Arantes, R.M.E., Assis, J.S.G., Ferreira, G.P., Oliveira, J.G., Kroon, E.G. and Campos, M.A. (2013) Nitric Oxide Synthase Expression Correlates with Death in an Experimental Mouse Model of Dengue with CNS Involvement. *Virology Journal*, **10**, 267. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-267>
- [7] Solomon, T., Dung, N.M., Vaughn, D.W., Kneen, R., Thi, L., Thao, T., Raengsakulrach, B., Loan, H.T., Day, N.P., Farrar, J., Myint, K.S., Warrell, M.J., James, W.S., Nisalak, A. and White, N.J. (2000) Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Lancet*, **355**, 1053-1059.
- [8] Sahu, R., Verma, R., Jain, A., Garg, R.K., Singh, M.K., Malhotra, H.S., Sharma, P.K. and Parihar, A. (2014) Neurologic Complications in Dengue Virus Infection: A Prospective Cohort Study. *Neurology*, **83**, 1601-1609.

- <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000935>
- [9] Kutiyal, A.S. (2017) Dengue Haemorrhagic Encephalitis: Rare Case Report with Review of Literature. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **11**, 10-12.
- [10] Barbara, J.B. (1995) Blood Sampling and Film Preparation. Oxford, United Kingdom.
- [11] Flemans, F.G.J.H. (1973) As hemácias e suas precursoras. In: Atlas de citologia hematológica. Rio de Janeiro, Brasil.
- [12] Flemans, F.G.J.H. (1973) Granulócitos, monócitos, megacariócitos. In: Atlas de citologia hematológica. Rio de Janeiro, Brasil.
- [13] Flemans, F.G.J.H. (1973) Linfócitos, plasmócitos e seus precusores. In: Atlas de citologia hematológica. Rio de Janeiro, Brasil.
- [14] Zompi, S. and Harris, E. (2012) Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, **4**, 62-82. <https://doi.org/10.3390/v4010062>
- [15] Connell, K.E.O., Mikkola, A.M., Stepanek, A.M., Vernet, A., Hall, C.D., Sun, C.C., Yildirim, E., Staropoli, J.F., Lee, J.T. and Brown, D.E. (2015) Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. *American Association for Laboratory Animal Science*, **65**, 96-113. <https://doi.org/10.1128/JVI.00062-06>
- [16] Shresta, S., Sharar, K.L., Prigozhin, D.M., Beatty, P.R. and Harris, E. (2006) Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. *Journal of Virology*, **80**, 10208-10217. <https://doi.org/10.1128/JVI.00062-06>
- [17] Zellweger, R.M. and Shresta, S. (2014) Mouse Models to Study Dengue Virus Immunology and Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, **5**, 1-9.
- [18] Costa, V.V., Fagundes, C.T., Souza, D.G. and Teixeira, M.M. (2013) Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction. *American Journal of Pathology*, **182**, 1950-1961. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.027>
- [19] Kenneth, M., Paul, T. and Walport, M. (2010) Imunobiologia de Janeway. Rio Grande do Sul, Brasil.
- [20] Palomino, D.C.T. and Marti, L.C. (2015) Chemokines and Immunity. *Hospital Israelita Albert Einstein*, **13**, 469-473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>
- [21] Campos, M.A., Souza, K.P.R., Oliveira, D.B. and Kroon, E.G. (2016) Neurotropic Dengue Virus Infections. In: *Neurotropic Viral Infections*, Springer International Publishing, Cham, 259-272. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33133-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33133-1_10)
- [22] Akkina, R. (2014) Humanized Mice for Studying Human Immune Responses and Generating Human Monoclonal Antibodies. *Microbiology Spectrum*, **2**.
- [23] Figueiredo, L.B., Cecílio, A.B., Ferreira, G.P., Drumond, B.P., Oliveira, J.G., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P. and Kroon, E.G. (2008) Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. *Iranian Journal of Microbiology*, **5**, 314-316.
- [24] Russell, P.K., Nisalak, A., Sukhavachana, P. and Vivona, S. (1967) A Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. *The Journal of Immunology*, **99**, 285-290.
- [25] Camilla, C., Defoort, J.P., Dellage, M., Auer R.Q.J., Lary, T., Hamelik, R., Prato, S., Casano, B., Martin, M. and Fert, V. (1998) A New Flow Cytometry-Based Multi-Assay System. 1. Application to Cytokine Immunoassays. *Cytometry: Supplement*, **8**, 132.
- [26] Stordeur, P., Poulin, L.F., Craciun, L., Zhou, L., Schandené, L., De Lavareille, A.,

- Goriely, S. and Goldman, M. (2002) Cytokine mRNA Quantification by Real-Time PCR. *The Journal of Immunology Methods*, **259**, 55-64. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00489-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00489-6)
- [27] Giuliatti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C. (2001) An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, **25**, 386-401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- [28] Lye, D.C., Archuleta, S., Syed-Omar, S.F., Low, J.G., Oh, H.M., Wei, Y., *et al.* (2017) Prophylactic Platelet Transfusion plus Supportive Care versus Supportive Care alone in Adults with Dengue and Thrombocytopenia: A Multicentre, Open-Label, Randomised, Superiority Trial. *The Lancet*, **389**, 1611-1618. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30269-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30269-6)
- [29] Sarathy, V.V., White, M., Li, L., Gorder, S.R., Pyles, R.B., Campbell, G.A., *et al.* (2015) A Lethal Murine Infection Model for Dengue Virus 3 in AG129 Mice Deficient in Type I and II Interferon Receptors Leads to Systemic Disease. *Journal of Virology*, **89**, 1254-1266. <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-14>
- [30] Neelika, G. and Ogg, G.S. (2013) T Cell Responses in Dengue Viral Infections. *Journal of Clinical Virology*, **58**, 605-611. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.023>



# Trypanosoma cruzi-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2

André Cronemberger-Andrade<sup>1</sup>, Patrícia Xander<sup>1</sup>, Rodrigo Pedro Soares<sup>2</sup>, Natália Lima Pessoa<sup>2</sup>, Marco Antônio Campos<sup>2</sup>, Cameron C. Ellis<sup>3</sup>, Brian Grajeda<sup>3</sup>, Yifat Ofir-Birin<sup>4</sup>, Igor Correia Almeida<sup>3</sup>, Neta Regev-Rudzki<sup>4</sup> and Ana Claudia Torrecilhas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, <sup>2</sup> Instituto René Rachou/FIOCRUZ – MG, Belo Horizonte, Brazil, <sup>3</sup> Border Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso (UTEP), El Paso, TX, United States, <sup>4</sup> Department of Biomolecular Sciences, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Noelia Lander,  
University of Georgia, United States

### Reviewed by:

Carlos A. Buscaglia,  
National Council for Scientific and  
Technical Research  
(CONICET), Argentina  
Celo Geraldo Freire-de-Lima,  
Federal University of Rio de  
Janeiro, Brazil

### \*Correspondence:

Ana Claudia Torrecilhas  
ana.torrecilhas@unifesp.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Parasite and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and Infection  
Microbiology

Received: 06 November 2019

Accepted: 26 February 2020

Published: 20 March 2020

### Citation:

Cronemberger-Andrade A, Xander P, Soares RP, Pessoa NL, Campos MA, Ellis CC, Grajeda B, Ofir-Birin Y, Almeida IC, Regev-Rudzki N and Torrecilhas AC (2020) Trypanosoma cruzi-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:99. doi: 10.3389/fcimb.2020.00099

Extracellular vesicles (EVs) shed by trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* have the ability to interact with host tissues, increase invasion, and modulate the host innate response. In this study, EVs shed from *T. cruzi* or *T. cruzi*-infected macrophages were investigated as immunomodulatory agents during the initial steps of infection. Initially, by scanning electron microscopy and nanoparticle tracking analysis, we determined that *T. cruzi*-infected macrophages release higher numbers of EVs (50–300 nm) as compared to non-infected cells. Using Toll-like-receptor 2 (TLR2)-transfected CHO cells, we observed that pre-incubation of these host cells with parasite-derived EVs led to an increase in the percentage of infected cells. In addition, EVs from parasite or *T. cruzi*-infected macrophages or not were able to elicit translocation of NF- $\kappa$ B by interacting with TLR2, and as a consequence, to alter the EVs the gene expression of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ), and STAT-1 and STAT-3 signaling pathways. By proteomic analysis, we observed highly significant changes in the protein composition between non-infected and infected host cell-derived EVs. Thus, we observed the potential of EVs derived from *T. cruzi* during infection to maintain the inflammatory response in the host.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, toll-like receptor 2, inflammation, extracellular vesicles, macrophage

## INTRODUCTION

Research interest in extracellular vesicles (EVs) and their involvement in cell-cell, cell-pathogen (parasites, viruses, bacteria, and fungi) or pathogen-pathogen communication and modulation processes in infectious and inflammatory diseases has continuously grown in recent years (Campos et al., 2010). The study of EVs has mainly focused on the types of membrane vesicles secreted into the extracellular compartment isolated from different cells, tissues, and biofluids in healthy and pathological conditions. EVs may be divided into exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies (Théry et al., 2018; Mathieu et al., 2019; Witwer and Théry, 2019). These types of EVs have

different origins, markers, and sizes (Théry et al., 2002; Tkach and Théry, 2016; van Niel et al., 2018; Mathieu et al., 2019; Witwer and Théry, 2019). EVs are heterogeneous membranous particles from 20 nm to 5  $\mu$ m, differing in their biogenesis, molecular composition, biodistribution, and function (Campos et al., 2010; Lässer et al., 2011; Street et al., 2012; Madison et al., 2014). EVs are secreted by either prokaryotic or eukaryotic cells, thus extending their phenotype (Campos et al., 2010; Torrecilhas et al., 2012).

EVs from parasitic protozoa have been demonstrated as important virulence factors (Gonçalves et al., 1991; Trocoli Torrecilhas et al., 2009; Torrecilhas et al., 2012; Marcilla et al., 2014; Nogueira et al., 2015). They function as cell-to-cell effectors in the host-parasite interaction and manipulation of the host immune system (Aline et al., 2004; Bhatnagar et al., 2007; Pope and Lässer, 2013; Regev-Rudzki et al., 2013; Marcilla et al., 2014; Coakley et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). EVs isolated from parasitic protozoa contain a wide variety of molecules, including proteins, glycoconjugates, lipids, RNAs, non-transcribed RNAs, and microRNAs (Torrecilhas et al., 2012). In infection-derived inflammatory processes, EVs can induce release of cytokines and nitric oxide. EVs may promote an inflammatory/immunosuppressive response in the host environment, thus affecting the subsequent immunopathological events, resulting in pathogen escape and invasion of the host cells (Silverman and Reiner, 2011; Nogueira et al., 2015). In infective host cell-derived *T. cruzi* trypomastigotes,  $\alpha$ -galactosyl ( $\alpha$ -Gal)-enriched EVs strongly trigger proinflammatory responses in murine macrophages via Toll-like receptor (TLR2)-dependent pathway, and the proteomic analysis of these EVs revealed the presence of several members of the TS/gp85 superfamily (Nogueira et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). In *Leishmania* spp., it has been shown that promastigote-derived EVs contain virulence factors such as GP63 and lipophosphoglycan (LPG), and several molecules involved in the pathogenesis of *Leishmania* (Silverman et al., 2010; Atayde et al., 2015; Barbosa et al., 2018), suggesting that these EVs can contribute in the leishmaniasis infection and disease progression. Moreover, EVs isolated from *Plasmodium*-infected red blood cells (iRBC) transfer genetic material to the host cell and induce parasite gametocytogenesis, demonstrating a mechanism of interaction and communication with host cells as well as between parasites. In malaria, EVs can also mediate cellular communication processes, delivering virulence factors in the circulation and inflammatory infiltrate (Regev-Rudzki et al., 2013). It is known that inflammatory responses occur during *T. cruzi* infection and that this can be reproduced by the parasite EVs (Nogueira et al., 2015). Likewise, Dr Ramirez's group showed that metacyclic-trypomastigotes induce the release of TGF- $\beta$  coated plasma membrane vesicles from blood macrophages and lymphocytes, which could further increase parasite infectivity (Cestari et al., 2012; Wyllie and Ramirez, 2017; Gavinho et al., 2018; Rossi et al., 2019). However, it is unknown whether EVs released by *T. cruzi*-infected macrophages or EVs isolated from parasite modulate host inflammatory responses and cell invasion.

The invasion of host cells is a key process in *T. cruzi* infection and it has been found that parasite surface molecules play an important role for parasite attachment and entry

in the parasitophorous vacuole (Andrews, 2002). Cell-derived trypomastigotes induce lysosome mobilization, cytoskeleton rearrangements, membrane repair and elevation of  $Ca^{2+}$  and cAMP concentrations within the host cell (Tardieux et al., 1992, 1994; Burleigh and Andrews, 1998; Andrews, 2002). In fact, these processes are modulated by parasite EVs that were found to contain the major surface glycoconjugates of the parasite (Ribeiro et al., 2018).

Therefore, in this work, we evaluated whether EV shed by *T. cruzi* infected macrophage modulate inflammatory responses and if EVs from cell-derived trypomastigotes could also modify the cell invasion and the signaling mechanisms involved in this process.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

All experimental procedures used in this work were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of São Paulo, protocol 1073090614.

### Cell Lines and Parasite Infection

Tissue culture-derived trypomastigotes (TCT) of the *T. cruzi* Y strain were collected from the culture supernatants after 5 days after infection of LLCMK<sub>2</sub> epithelial cells (monkey kidney epithelial cell line, ATCC® CCL-7™, VA, USA). Cells were maintained in low-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, CA, USA) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. THP-1 (human peripheral blood monocyte cell line, ATCC® TIB-202™, VA, USA) cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were tested for *Mycoplasma* contamination by using the polymerase chain reaction (PCR) methodology (Uphoff and Drexler, 2002). The THP-1 monocytes were induced to differentiate into macrophages by the addition of phorbol myristate acetate (50 ng/mL) (Calbiochem, CA, USA) for 24 h in serum-free RPMI 1640. To determine the number of infected cells and the number of intracellular parasites, cells were cultured on circular glass coverslips and subsequently stained with Giemsa.

### Isolation and Characterization of EVs

EVs from trypomastigotes (EV-TY) were obtained by incubation of parasites for 2 h in DMEM containing 2% glucose at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and purified by size-exclusion chromatography (SEC), as previously described (Ribeiro et al., 2018). To obtain EVs from THP-1 infected and non-infected macrophages (respectively EV-THP-1inf and EV-THP1) were incubated with *T. cruzi* trypomastigotes at a 1:10 ratio (1 mL) for 4 h at 37°C/5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 containing 10% ultracentrifuged FBS to remove serum EVs. After infection, the THP-1 macrophages were washed three times with PBS, and then maintained in the same fresh medium for the production of EVs. Controls included THP-1 cells without *T. cruzi* infection. EVs were then recovered at the indicated times by differential ultracentrifugation of culture supernatants. Briefly, the supernatants were submitted to 10 min

at  $500 \times g$ , followed by 10 min at  $3,000 \times g$  and 15 min at  $8,000 \times g$  to remove cells and cellular debris. EVs were then pelleted at  $100,000 \times g$  for 1 h using a T-890 fixed angle rotor (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) as previously described in MISEV guideline (Théry et al., 2018).

The obtained EVs were characterized by NTA analysis to determine concentration and size using NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipped with a 405 nm laser and coupled to a CCD camera. Data were analyzed using NTA software (version 2.3). Each sample diluted (1:10) in PBS was analyzed in triplicate; and loaded into the instrument for 30 s at 20 frames per second with the camera level set to 14.

### Scanning Electron Microscopy (SEM)

THP-1 cells infected or not with *T. cruzi*, and THP-1 cells treated with EV-TY were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution as reported elsewhere (Nogueira et al., 2015). The cells were post fixed with osmium tetroxide, treated with tannic acid, and dehydrated with ethanol. Samples were observed in a Field Emission FEI Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI, OR, USA).

### Immunoblotting

EVs samples containing 10  $\mu$ g of protein, quantified by Micro BCA Assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes using standard procedures. The presence of exosome proteins and parasite surface proteins was evaluated by incubating membranes with primary antibodies against CD63, CD9, MHC II (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and the serum of a rabbit immunized with the extract of *T. cruzi* TCT membranes (Schenkman et al., 1991). Detection was achieved using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (KPL Antibodies Seracare, MA, USA) secondary Abs and visualized with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

### CHO Cell Lines

The CHO reporter cell lines (CHO/CD14, CHO/CD14/TLR-2, and CHO/CD14/TLR-4) were generated as described (Lien et al., 1999). These reporter cell lines contain a human CD25 gene reporter under the control of the E-selectin promoter, which contains an NF- $\kappa$ B-binding site (Delude et al., 1998; Lien et al., 1999 and Campos et al., 2001). All CHO reporter cell lines were grown in Ham's F-12 medium containing 10% FBS, 10  $\mu$ g/ml ciprofloxacin, and 400 units/ml hygromycin B. Cells were plated at a concentration of  $10^5$ /well in 24-well tissue-culture dishes. Cells were incubated with EV-THP-1, EV-THP-1 infected (EV-THP-1 inf) and EV-TY. Medium alone, 100 ng/ml LPS (from *Escherichia coli* serotype 055: B5; Sigma-Aldrich, MI, USA), and UV-killed *Staphylococcus aureus* at a ratio of *S. aureus*/cell of 500:1 (American Type Culture Collection 12.692), were used as controls. After 24 h of stimulation, cells were stained with PE-labeled anti-CD25 (mouse MAAb to human CD25, PE conjugate; Caltag Laboratories, CA, USA). The cells were examined by flow cytometry (BD Biosciences, NJ, USA), and analyses were

performed using Cell Quest software (BD Biosciences, NJ, USA) (Campos et al., 2001).

### Infection Assays

TLR2- or TLR4-transfected CHO/CD14 cells were grown on 13 mm diameter glass coverslips in a 24-well dish and washed twice with DMEM/F12 medium (with antibiotics). Cells were incubated with culture supernatant or EV-TY ( $10^5$  and  $10^6$  particles/well) for 30 min, at  $37^\circ\text{C}$ , in RPMI-10% FBS. These cells were infected with TCTs (1:10, host cell: parasite ratio), for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , and then washed twice with RPMI without FBS. Non-adherent parasites were removed by addition of Lymphoprep (Axis-Shield, Norton, MA) to the cell layers, followed by two washes with PBS. The cells were incubated with RPMI-10% FBS for 18 h, at  $37^\circ\text{C}$ , or immediately fixed with methanol and stained with Hoechst fluorescent dye (Molecular Probes, Invitrogen Co., Carlsbad, CA). All experiments were performed in triplicate, and 24 photos of each replicate were made using a digital video-imaging fluorescent inverted microscope (Nikon), enabling the counting of infected and non-infected cells.

### Gene Expression

To evaluate the gene expression, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used in THP-1 cells untreated as control, or THP-1 incubated with EV-THP-1 inf, EV-TY ( $10^8$  particles/mL), or infected with trypomastigotes (TY). Total RNA was obtained from macrophages by using TRIzol reagent (Life Technologies, CA, USA). RNA samples were subjected to DNase treatment and cDNA synthesis with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). RNA samples were quantified by UV absorption in a spectrophotometer (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher) followed by electrophoresis in 1.5% agarose gels to assess RNA integrity. RNA samples with high quality and integrity were subjected to DNase treatment (RQ1 RNase-free DNase; Promega, Madison, WI, United States) and cDNA synthesis with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Specific primers for TLR2, TLR4, IL1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ , STAT1, and STAT3 genes were used to analyze gene expression using RT-qPCR; all sequences were from PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) (Supplementary Table 1). The expression levels were normalized to those of the GAPDH and Actin-Beta (ACTB) reference genes using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  cycle threshold method (Schmittgen and Livak, 2008). Differences in the relative expression levels of target genes were determined by comparison between noninfected cells (as reference samples) and the cells infected or treated with EVs. The gene expression from the reference sample was adjusted to be equal to 1.00. All qRT-PCR procedures were developed following the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009).

### LC-MS/MS and Bioinformatic Analysis

EVs (~200  $\mu$ g of protein) from uninfected and infected macrophages (EV-THP-1 and EV-THP-1inf) were concentrated in a Speedvac. For LC-MS/MS, the filter-aided sample preparation (FASP) method was used, following the

manufacturer's protocol (Expedeon, San Diego, CA). The samples were reduced by adding 10 mM DTT for 30 min at room temperature (RT) and centrifuging in a spin filter at  $14,000\times g$  for 15 min at rt. After washing twice with 8 M urea in 50 mM Tris-HCl buffer, samples were washed again  $2\times$  with the urea/Tris-HCl buffer and  $3\times$  with 50 mM ammonium bicarbonate. Then, samples were digested with trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as described by Ribeiro et al. (2018). Peptides were eluted from the filter using 0.1% formic acid and subjected to high-resolution LC-MS/MS analysis in a QE Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipped with a Nanospray Flex Ion Source (Thermo Fisher Scientific). Using a Dionex UltiMate 3000 RSLCnano UHPLC system (Thermo Fisher Scientific), peptides were separated with a PicoFrit column (75- $\mu\text{m}$  ID  $\times$  OD 360  $\mu\text{m}$ , 25-cm length, New Objective, Woburn, MA) packed in-house with reversed-phase Aqua C18 porous silica (5  $\mu\text{m}$ , 125 Å, Phenomenex). The column was equilibrated before sample injection at a flow rate of 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  with 95% solvent A (100%  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% formic acid) and 5% solvent B (90% acetonitrile, 0.1% formic acid). Samples were then injected onto the C18 column, and the same equilibration phase was run for 10 min. Elution of the peptides was performed using a linear gradient of solvent B up to 35% for 85 min, followed by a 5-min increase to 95%, where the plateau was maintained for 9 min. The column was then re-equilibrated with 5% solvent B for 10 min before injection of the next sample. An automated 2-h run was programmed into the Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific), and each sample was analyzed in technical duplicates. Full scan spectra were collected from the 400–1,600  $m/z$  range. Peptides were not excluded based on charge state, and 1 microscan for both full and MS/MS scans were acquired.

The spectra were searched using Proteome Discoverer (PD) 2.1.1.21 (Thermo Fisher Scientific) and filtered via Percolator with an estimated false-discovery rate (FDR) of 1 against sequences from *T. cruzi*, human, bovine, human keratin, and porcine trypsin. Parameters for the database search were as follows: 2 and 1 Da for peptide and fragment mass tolerance, respectively, cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation as fixed and variable modifications, respectively. The dataset was further processed through Scaffold Q + 4.8.2 (Proteome Software, Portland, OR), merged, and the probability of their peptide assignments and protein identifications was assessed. Files were exported from Scaffold 4.8.2 for further analysis in Scaffold PerSPECTives (Proteome Software). Only peptides with  $\geq 95\%$  probability were accepted. The criteria for human protein identification included detection of at least two uniquely identified peptides and a probability score of  $\geq 99\%$ . The results were further filtered with the following peptide thresholds: Fisher's exact test ( $p$ -value)  $\leq 0.001$ ; fold change  $\geq 50\%$  and  $\leq 50\%$ . Gene ontology (GO) annotation was carried out using FunRich (version 3.1.3; <http://www.funrich.org/>) with the NCBI database (downloaded on 28 March 2019).

### Statistics

All statistical tests were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, CA, USA). The Mann-Whitney  $U$ -test

was used to determine differences between two groups. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was carried out to compare multiple groups. The differences were considered significant when  $p$  was  $< 0.05$ .

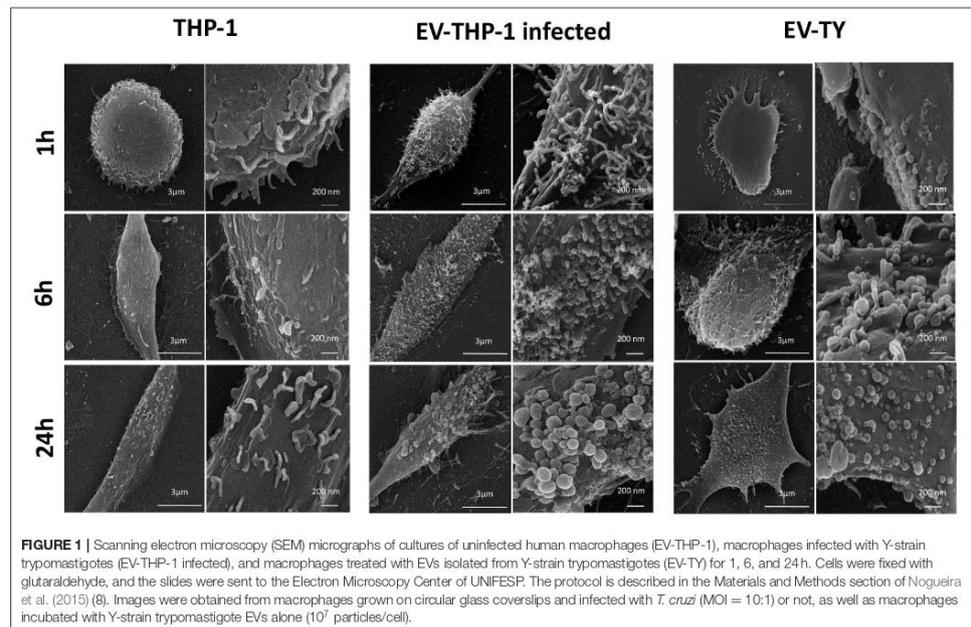
## RESULTS

### Increased Numbers of EVs Are Released From Macrophages Infected With *T. cruzi*

Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of THP-1-derived macrophages uninfected (EV-THP-1), infected (EV-THP-1 inf), or only treated with EVs from trypomastigotes (EV-TY) showed the presence of round-shaped vesicles with the expected size for exosomes (50–100 nm) and ectosomes (100–200 nm) on the surface of their plasma membrane (Figure 1). Compared to uninfected macrophages and those incubated with EV-TY, infected macrophages released a larger number of vesicles. EVs were isolated from the supernatants of THP-1 macrophages through a series of ultracentrifugation steps. The NTA showed a size distribution of 50–200 nm for all EVs (Supplementary Figure 1). The concentration of vesicles was also measured in the same experiment, revealing an increase in vesicle release by infected THP-1 macrophages (EV-THP-1 inf) (Figure 2A). In the immunoblotting analysis, the exosomal marker proteins CD63 and CD9 and the surface membrane protein MHC II were detected in EV-THP-1 and EV-THP-1 inf samples (Figure 2B). The presence of parasite surface proteins was only found in the EV-TY group (Figure 2B). The increase in EVs released from infected macrophages is related to presence of parasite from 24 to 72 h (Figure 3A). However, the EVs release did not appear to increase when the number of parasites augment in infected cells (Figure 3B). After that, cells start to lyse and new trypomastigotes are released in the extracellular milieu.

### The Interaction of EVs With TLR2 Is Critical for the Induction of NF- $\kappa$ B Activation and Increase the Susceptibility of Target Cells to *T. cruzi* Infection

Next, we evaluated the importance of the interaction of EVs from *T. cruzi* trypomastigotes with TLRs for the interaction and internalization of the parasite. The CHO reporter cell line contained an inducible NF- $\kappa$ B-dependent promoter driving the surface expression of CD25 (Campos et al., 2001). CHO cells were incubated with different concentrations of (EV-TY) and with EV-THP-1inf or EV-THP-1. The expression of CD25, which indicates activation of NF- $\kappa$ B, was measured by flow cytometry. These EVs did not increase the induction of CD25 expression by CHO/CD14 or CHO/CD14/TLR4 cells (Figure 4). Previous studies using wild-type, TLR2- or TLR4-knockout murine macrophages from C57BL/6 mice (WT, TLR2 $^{-/-}$ , or TLR4 $^{-/-}$  C57BL/6) showed that TLR2 but not in TLR4 was required for production of nitric oxide (NO) or TNF- $\alpha$  following stimulation with EV-TY and activate MAPKs (ERK 1/2, p38 and JNK) (Nogueira et al., 2015). The data presented in Figure 4



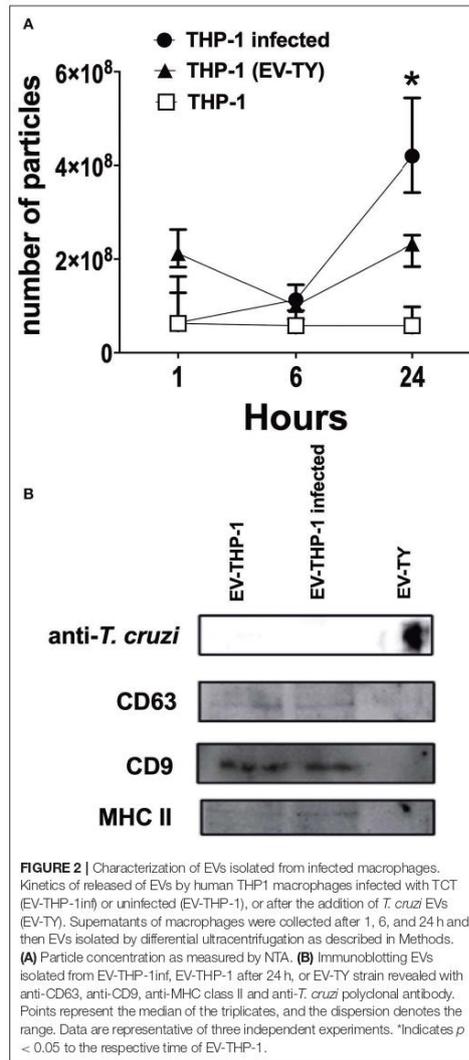
confirmed these previous results showing that the expression of CD25 through the activation of NF- $\kappa$ B was induced in CHO/CD14/TLR2, but not CHO/CD14/TLR4, exposed to EV-TY. Importantly, EV-THP-1 and EV-THP-1inf were also found to quantitatively promote the expression of CD25 in CHO/CD14/TLR2 cells, but not TLR4 (Figure 4), indicating that both EVs derived from *T. cruzi* (EV-TY) and macrophages interact with TLR2, but not TLR4, activating NF- $\kappa$ B. This result also suggested that induction by macrophage EVs was not due to the presence of parasite molecules, as when we used the same number of particles of non-infected macrophages, the induction was similar. The presence of tGPI-mucins and glycoinositolphospholipids (GIPLs) in the EV-TY was likely responsible for the induction of potent inflammatory responses in macrophages (Almeida et al., 2000; Trocoli Torrecilhas et al., 2009).

The participation of TLR2 in the host-cell infection by *T. cruzi* was then investigated. To test this hypothesis, infection experiments were performed in CHO/CD14 cells, transfected or not with TLR2 or TLR4. Upon prior exposure to culture supernatants of trypanomastigotes or EVs, cells transfected with TLR2, but not TLR4- or non-transfected cells were increase the susceptibility of target cells to *T. cruzi* infection. A remarkable (up to 6–7-fold) increase in percentage of infected cells was observed in TLR2-transfected CHO/CD14 cells exposed either to total shedding or EV-TY (Figure 5).

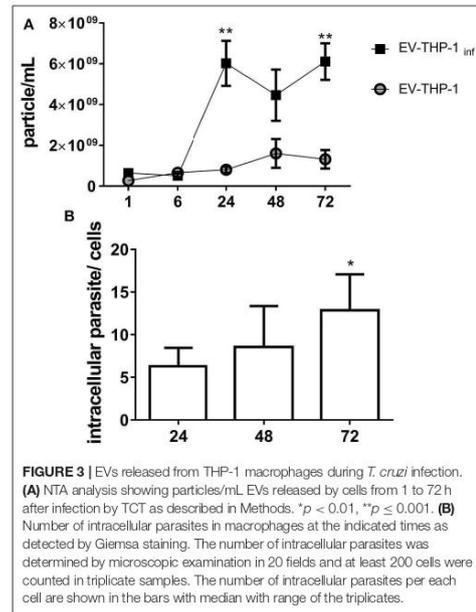
### EVs Induce the Differential Expression of TLR2, TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ and STAT1/STAT3

TLRs are involved in the recognition of *T. cruzi* following the activation of host cells to produce TNF- $\alpha$ , IL-12, and NO (Campos et al., 2004; Koga et al., 2006). Macrophages showed differences in TLR gene expression upon stimulation with EVs and *T. cruzi* infection. We analyzed the gene expression of TLR2, TLR4 by RT-qPCR in macrophages untreated and treated with EV-TY, EV-THP-1control, and EV-THP-1 inf. The gene expression analysis in macrophages treated with EV-THP-1inf and EV-TY revealed alterations in TLR2 and TLR4 (Figure 6).

TLR2 expression is essential for proinflammatory cytokine production (Campos and Gazzinelli, 2004). RT-qPCR analysis was performed to assess the changes in gene expression of cytokines and transcription factors. Macrophages, therefore, were incubated with EVs (EV-THP-1 control, EV-THP-1 inf and EV-TY) and also infected with *T. cruzi*. Evaluation of the cytokine gene expression profile revealed an increase in IL-1 $\beta$  levels after 6 h in both *T. cruzi*-infected cells and in those exposed to EV-THP-1inf (Figure 6). There was also an increase in the transcript levels of IL-1 $\beta$  after 1 h of *T. cruzi* infection. After 24 h of *T. cruzi* infection or stimulation with EV-THP-1 inf, no change in IL-1 $\beta$  transcript levels was observed, whereas a marked reduction was seen in cells that were treated with EV-TY or EV-THP-1.



After 1 and 6 h of *T. cruzi* infection, the cells showed elevated transcript levels of IL-6. The same result was observed after 1 and 6 h of treatment with EV-TY or EV-THP-1 inf. However, 24 h after the other treatments, there was a reduction in IL-6 gene expression, except for *T. cruzi* infection. In the TNF- $\alpha$  gene expression analysis, elevation of the transcript level was observed

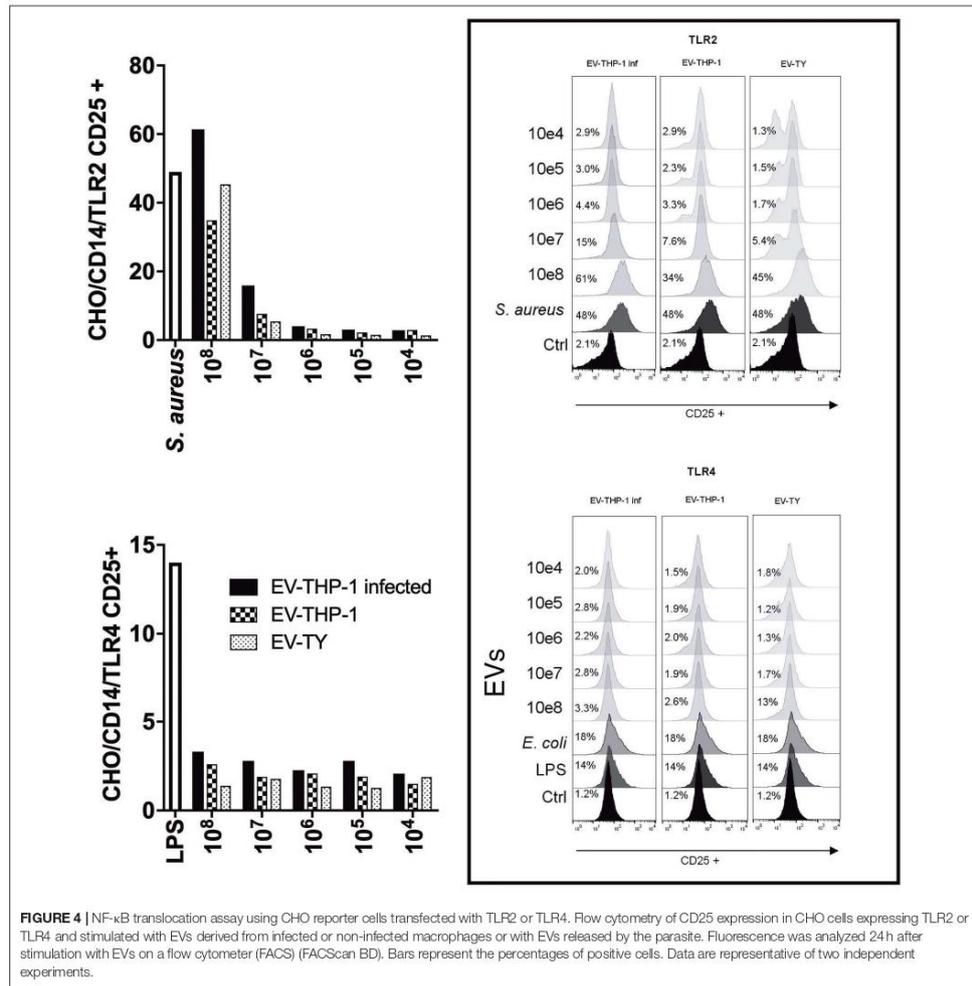


after 1 and 6 h of treatment with EV-THP-1inf and after 6 h of treatment with EV-THP-1. Only *T. cruzi* infection induced the gene expression of TNF- $\alpha$  at 24 h.

Signal transduction through cytokine receptor-binding occurs via the JAK/STAT pathway signaling. We observed the gene expression of STAT1 and STAT3 in the macrophages stimulated with the different EVs. STAT1 and STAT3 gene expression increased only in response to *T. cruzi* infection (Figure 7). Stimulation with the different EVs reduced the gene expression of STAT3 at 1 and 6 h (Figure 7).

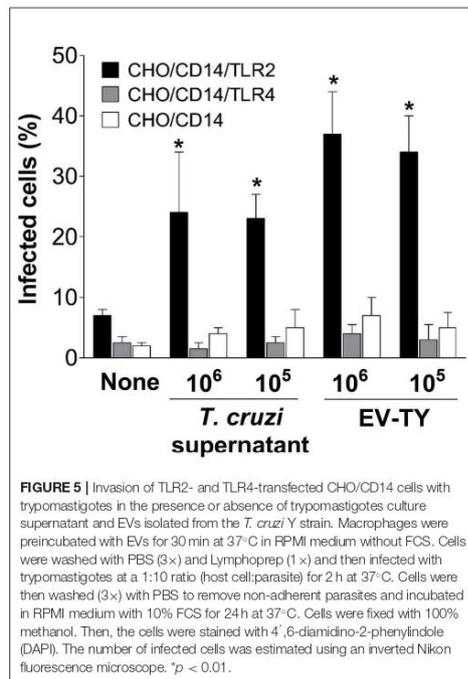
### EVs Released by Infected Macrophages Have Distinct Contents and Parasite Proteins

We performed mass spectrometry-based proteomic analysis (LC-MS/MS) to determine the content of the EVs purified from uninfected (EV-THP-1) and infected macrophages (EV-THP-1 inf). A total of 123 proteins were found in THP-1-EVs and 89 were found in EV-THP-1 inf, from a total of 154 proteins in both samples (Figure 8A). Using FunRich (version 3.1.3), we compared the list of identified proteins to previously published EV data in the Exocarta database (www.exocarta.org) and found that the majority of the proteins had been previously observed to be present in EVs from different sources (Figure 8B). *T. cruzi*-infected host-cell derived EVs carry proteins from the parasite, as previously described (Ramirez



et al., 2017). We also looked for *T. cruzi* proteins in EV-THP-1 inf. We found 6 proteins (i.e., HSP60, trypanothione peroxidase, trans-sialidase Group II, flagellar calcium-binding protein, surface protein TolT and paraflagellar rod protein 2) (Supplementary Table 1). We also compared the levels of abundance of the 58 common proteins by calculating their fold change. The abundance of 20 proteins increased and 38 decreased after infection with *T. cruzi* (Supplementary Table 2). Most of the proteins found in EV-THP-1 and EV-THP-1 inf

are involved in binding, immunological and metabolic processes based on GO term annotations (Figure 8C). Moreover, the majority of the proteins in EV-THP-1 and EV-THP-1 inf were localized in exosomes (Figure 8D). Noteworthy, there was a higher percentage of proteins with catalytic activity in EV-THP-1 inf, particularly enzymes such as trans-sialidase (Figure 8E). It is possible that some of these proteins from *T. cruzi* were not directly associated with the EVs obtained from infected macrophages and were released in the culture supernatant of



the infected cells concomitantly with EV-THP-1 inf production. Furthermore, although unlike, the presence of remaining proteins from the parasites used to infected cells cannot be fully excluded.

## DISCUSSION

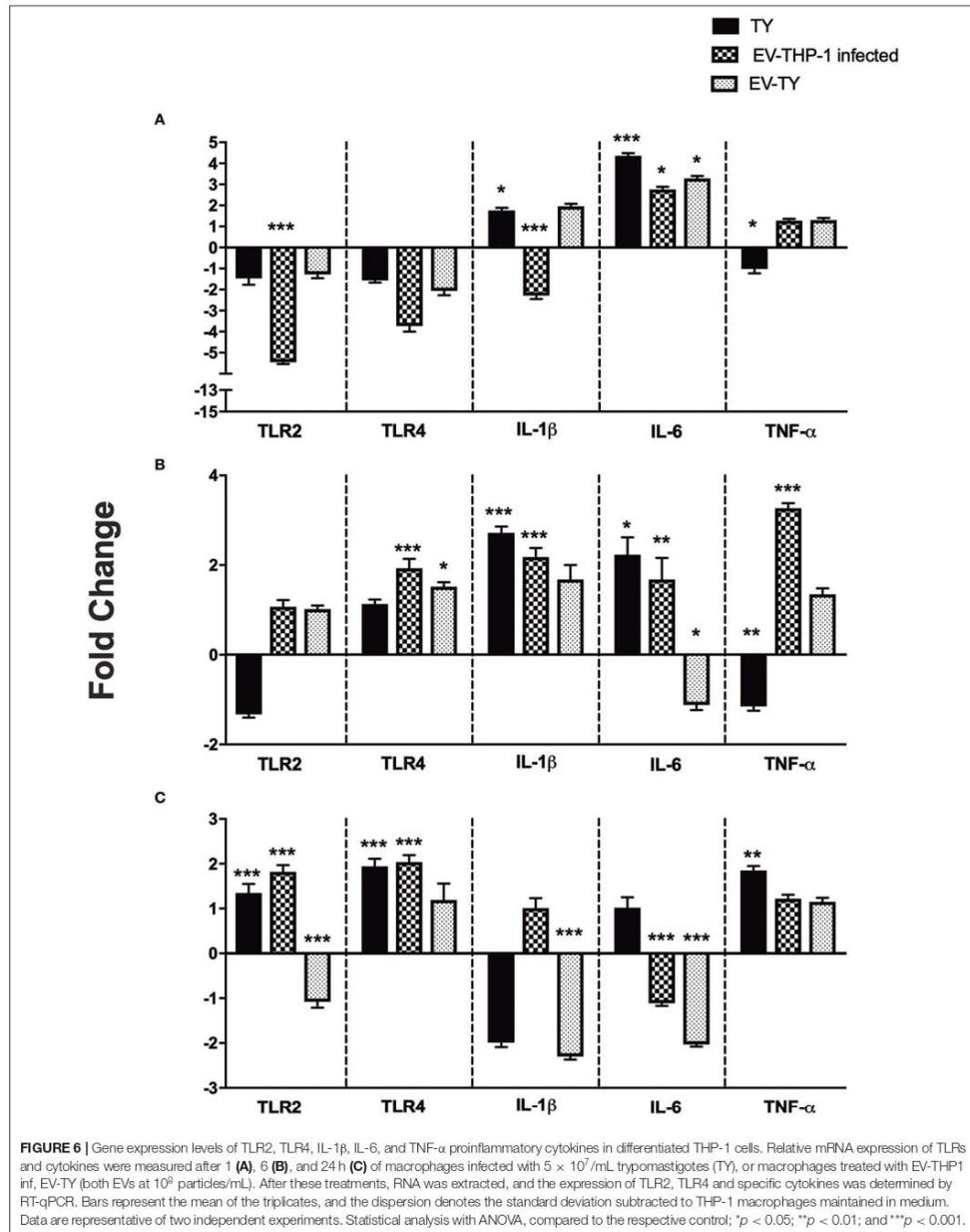
Macrophages and other mononuclear cells are the host's first line of defense to combat infection of intracellular parasites, such as *T. cruzi*. The release of EVs by *T. cruzi* promotes the activation of murine macrophages (Nogueira et al., 2015). Here, we demonstrate that EVs derived from macrophages infected with *T. cruzi* also modulate the activation of other human THP-1 macrophages to maintain the inflammatory response in the course of infection.

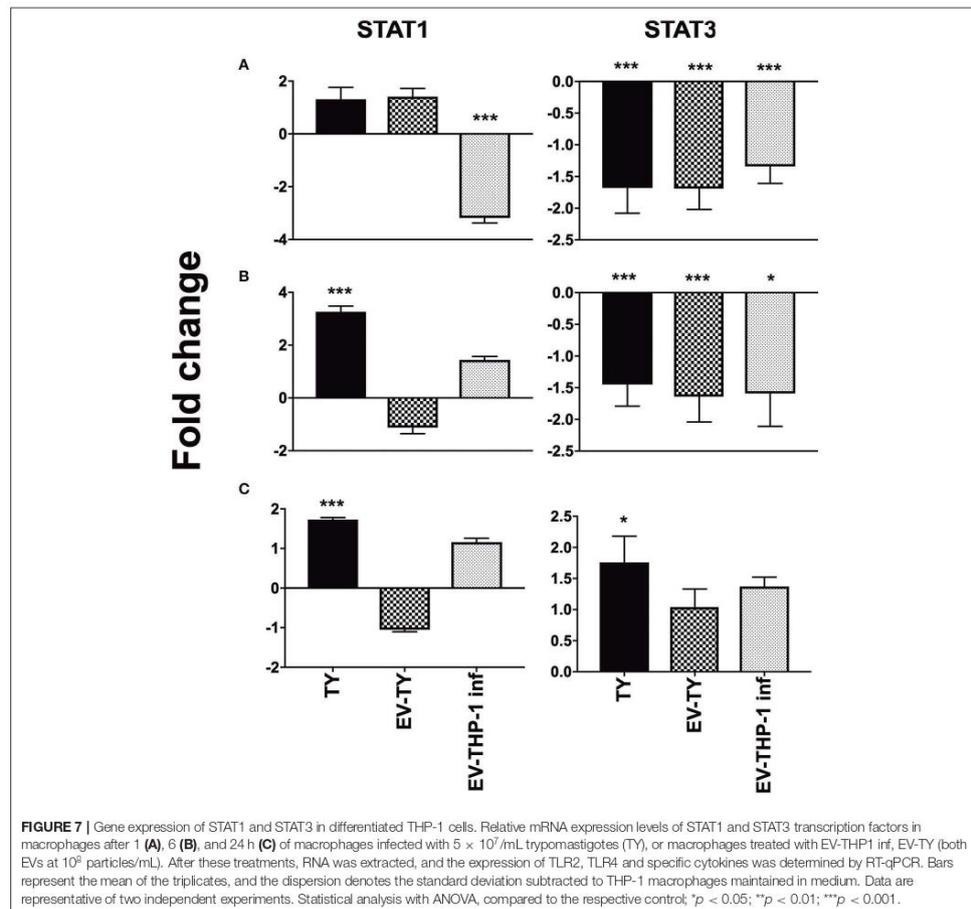
The recognition and response to pathogenic organisms by the immune system is essential for infection control. The expression of TLRs is critical for the response during the early stages of infection for the activation of the immune response. A large number of pathogens express ligands for different TLRs. *T. cruzi* trypomastigote-derived mucin-like glycoproteins (tGPI-mucins) are strong proinflammatory molecules and agonists for the TLR2-TLR6 heterodimer (Campos et al., 2001). *T. cruzi*

also express other glycoconjugates such as GIPLs, which activate TLR4 (Almeida et al., 2000; Oliveira et al., 2004).

In recent years, there has been a growing number of studies showing the capacity of EVs to modulate the immune response, especially in the relationship between parasite and host (Campos et al., 2010; Marcilla et al., 2014). Different strains of *T. cruzi* have been shown to release EVs and promote the activation of macrophages via TLR2 (Nogueira et al., 2015). EVs isolated from macrophages infected with intracellular pathogens (*Mycobacterium bovis* BCG and *M. tuberculosis*) induce a TLR/MyD88-dependent proinflammatory response in naive macrophages (Bhatnagar et al., 2007). In this work, we observed that EVs derived from *T. cruzi*-infected THP-1 human macrophages were able to induce the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus by interacting with TLR2. EVs released by uninfected THP-1 cells also activated the cells via TLR2. However, the amount of EVs produced by the infected cells was 10-fold higher than that produced by the uninfected cells, showing that the amount of EVs is the prime factor for activation. In addition, uninfected macrophages produce EVs when there is tissue damage, which leads to the activation of these cells or dendritic cells and results in the secretion of TNF- $\alpha$  and other inflammatory mediators through the activation of the p38 MAPK pathway and NF- $\kappa$ B (Thomas and Salter, 2010). Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) could also be related to the mechanism of action of the EVs described herein. Among the DAMPs, we found heat shock proteins, hyaluronic acid,  $\beta$ -defensin 3 and HMGB1, which are recognized by TLR2 (Scheibner et al., 2006; Funderburg et al., 2007; Curtin et al., 2009).

Internalization and phagocytosis by phagocytic cells such as macrophages are crucial processes for initiation of the killing of intracellular pathogens. *T. cruzi* can invade different mammalian cell types (Yoshida, 2006). It has been demonstrated that metacyclic trypomastigotes can invade cells in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner by exocytosis and the recruitment of host lysosomes to the plasma membrane (Tardieux et al., 1994; Rodríguez et al., 1995). Another mechanism for *T. cruzi* entry in cells independent of lysosome recruitment has been described to occur through the activation of PI3K (Woolsey et al., 2003). Here we observed that macrophages infected with *T. cruzi*, as evaluated by SEM, showed an increase in the number of EVs budding from the plasma membrane after the 24-h culture period. This increase was also confirmed by NTA. The release of EVs can be regulated by changes in intracellular calcium levels. When cells were treated with calcium ionophore (A23187), an increase in the release of EVs was found (Savina et al., 2003). *T. cruzi* infection increases the Ca<sup>2+</sup> concentration in macrophages (Wilkowsky et al., 1996). Additionally, activated cells release a greater number of particles than non-activated cells (Théry et al., 2009). Thus, the increased release of EVs by infected macrophages is related to an increase in intracellular calcium after *T. cruzi* infection and macrophage activation. The size range of the EVs isolated herein (50–200 nm) corroborates that described in the literature (Raposo and Stoorvogel, 2013; Wang et al., 2015; Hui et al., 2018). EVs can further enhance the parasite's ability to invade the host cells through TLR2 signaling. We observed an increase in the number



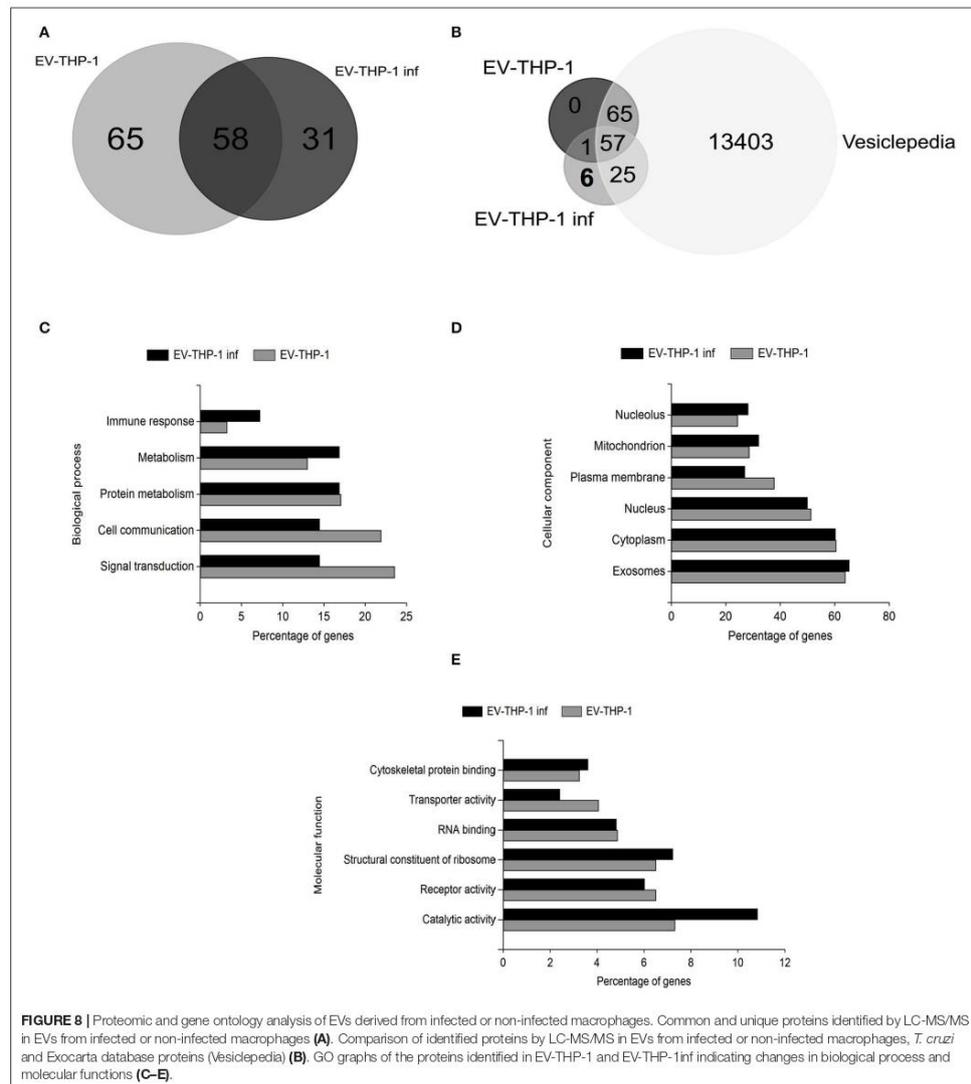


of infected cells when they expressed TLR2 and were incubated with parasite-derived EVs (EV-TY). EVs from *T. cruzi* participate in invasion through a mechanism independent of lysosome recruitment. The parasite invasion is associated with activation of PI3K (Wilkowsky et al., 2001). TLR2 activates PI3K during *T. cruzi* infection, leading to Rab5 activation, which is essential for phagosome formation (Maganto-Garcia et al., 2008). The release of EVs by infected macrophages is related to increased parasite replication, which was observed in macrophages infected with *T. cruzi* herein.

Similarly, in mice infected with *Mycobacterium bovis*, an increase in the release of plasma EVs is also related to an increase in the bacterial load (Singh et al., 2012).

We performed proteomic analysis to compare the content of the EVs released from uninfected THP-1 cells and THP-1 cells infected with *T. cruzi*. According to the Exocarta database ([www.exocarta.org](http://www.exocarta.org)), all the proteins found in the EVs have previously been identified in different types of cells and body fluids. The infection changed the composition of the EVs from the host cells; 65 proteins were unique to the EV-THP-1 cells, 31 were unique to the EV-THP-1 inf, and the expression of 58 proteins was altered in both EVs (20 proteins increase and 38 decrease).

The EVs isolated from macrophage supernatants showed the presence of the MHC II surface marker and the exosomal markers CD9 and CD63. No *T. cruzi* antigens could be detected by western blotting in EV-THP-1 and the presence



of plasma membrane glycoproteins expressing  $\alpha$ -Gal epitopes (i.e., TcMUCII mucins or tGPI-mucins) of the parasite in the EVs of macrophages infected by *T. cruzi* were not identified by total proteomic analysis. In this analysis only six parasite proteins were found in EVs from macrophages infected with *T.*

*cruzi* i.e., HSP60, trypanredoxin peroxidase, trans-sialidase Group II, flagellar calcium-binding protein, surface protein TolT and paraflagellar rod protein 2 (Lobo et al., 2019). These parasite proteins are involved in the recognition of the parasite by host cells, invasion, the adhesion of host cells, metabolism and the

induction of the host immune response (Godsel et al., 1995; Quanquin et al., 1999; Mattos et al., 2014; Urményi et al., 2014; Girard et al., 2018).

Previous studies of EVs derived from macrophages infected with intracellular microorganisms, such as mycobacteria and *Leishmania*, also identified proteins of these intracellular organisms that can be carried by EVs (Giri et al., 2010; Hassani and Olivier, 2013).

A variation in cytokine expression in macrophages stimulated with EVs was observed by RT-qPCR. An increase in IL-1 $\beta$  expression was evidenced in cells stimulated with TY and EV-THP-1inf at 6 and 24 h. IL-1 $\beta$  is related to the resistance of the host to infection through stimulation of the IL-1 receptor and activation of the adapter protein MyD88, leading to the production of NO in macrophages (Lima-Junior et al., 2013). Thus, increased IL-1 $\beta$  production may be important in infection control. In addition, immune activation through TLR2 and NF- $\kappa$ B receptors by macrophages has been found to rapidly elevate IL-1 $\beta$  levels (Petersen et al., 2005). Macrophages stimulated with EV-THP-1 and EV-THP-1 inf as well as those infected with *T. cruzi* displayed increased TNF- $\alpha$  expression. TNF- $\alpha$  is a proinflammatory cytokine produced by macrophages and lymphocytes and is important for the control of *T. cruzi* infection. The production of TNF- $\alpha$  by macrophages when stimulated with INF- $\gamma$  is associated with resistance to infection in mice (Silva et al., 1995). Increased IL-6 production was seen only at 6 h in response to treatment with the EVs of infected macrophages and parasites. Interleukin-6 is a proinflammatory cytokine produced primarily by T cells, dendritic cells and macrophages. It has been reported that IL-6 is not required for a strong Th1 response (Moskowitz et al., 1997) and that in the presence of TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , and IL-23 cause the differentiation of Th0 lymphocytes into Th17 lymphocytes (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Zhou et al., 2007).

The cytokine expression profile observed after stimulation with EVs released by infected cells demonstrates the modulation of the proinflammatory conditions caused by the release of these EVs. This cytokine expression profile also occurs in response to EVs from *Leishmania amazonensis*-infected macrophages, which promote the production of the inflammatory cytokines IL-12, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  (Cronemberger-Andrade et al., 2014). The production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 by macrophages is associated with the M1 type phenotype. M1 macrophages are responsible for polarizing the Th1 immune response, producing IL-12 and maintaining a low production level of IL-10. The main stimuli that favor the activation and polarization in M1 macrophages are LPS and IFN- $\gamma$  (Mantovani et al., 2004). It has recently been demonstrated that plasma-isolated EVs from chronic Chagas disease patients promote increased regulation of genes related to the proinflammatory response in macrophages (Chowdhury et al., 2017). In addition, the composition of the EVs isolated from the plasma of mice and patients revealed them to be of cardiac, lymphocyte, and macrophage origin (Chowdhury et al., 2017) thus demonstrating the importance of the potential modulation and activation of macrophages in the chronic phase of Chagas disease.

Signal transduction through IFN- $\gamma$  receptors is mediated by the phosphorylation of JAK and STAT1. The activation of

STAT1 is important for the production of a proinflammatory response. In STAT1 knockout mice, an increase in mortality was found due to increased numbers of parasites found in the blood and tissues (Kulkarni et al., 2015). We did not observe regulation by this mechanism after stimulation with the different EVs. STAT3 phosphorylation induces transcription of the gene encoding SOCS-3 (He et al., 2003). In macrophages infected with *M. tuberculosis*, NF- $\kappa$ B activation was found to be inhibited, and SOCS-3 expression was found to be induced as a mechanism of inflammatory response evasion (Nair et al., 2011; Hillmer et al., 2016). The production of IL-10 leads to increased expression of SOCS-3 and STAT3 in *T. cruzi*-infected cardiomyocytes due to the inactivation of NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK (Hovsepian et al., 2013). In the analysis of STAT3 expression, we observed a reduction in expression at 1 and 6 h and an increase only at 24 h after *T. cruzi* infection. The EVs released by infected or non-infected macrophages, as well as the parasite-derived EVs, modulated the response of macrophages favoring the maintenance of a proinflammatory response. It was previously shown that *T. cruzi* GIPLs were not able to activate STAT1 or STAT3 (Stahl et al., 2013). However, in that study the authors did not evaluate tGPI-mucins, which have much stronger proinflammatory than GIPLs (Almeida et al., 2000; Campos et al., 2001). Therefore, we conclude that tGPI-mucins (or TeMUCII mucins), which are present in trypanostigote-derived EVs (Ribeiro et al., 2018), and/or other molecules expressed on the surface of the parasite and the EVs (EV-TY) there from -TY may be involved in the activation of these transcription factors.

In summary, our results indicate that signaling through EVs during *T. cruzi* infection is essential in host-parasite interactions. After infection, increased amounts of EVs are released from infected macrophages that interact with TLR2 and stimulate the translocation of NF- $\kappa$ B. As a result of this interaction and activation, proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) are produced and maintain the inflammatory response generated by *T. cruzi* infection. In addition, human macrophage-derived EVs carry parasite proteins, which could be the reason for their increased ability to induce inflammatory responses.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

## ETHICS STATEMENT

All experimental procedures used in this work were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of São Paulo, protocol 1073090614.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC-A, PX, IA, YO-B, NR-R, and AT conceived and designed the experiments. AC-A, PX, YO-B, and AT performed most

experiments. NP and MC assisted in NF- $\kappa$ B translocation assay. IA, CE, and BG performed the proteomic analysis. AC-A, PX, YO-B, and AT wrote the manuscript. AC-A, PX, RS, YO-B, IA, NR-R, and AT contributed to final manuscript. All the authors reviewed the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the FAPESP (2016-01917-3) and doctoral fellowship from CNPq and CAPES. IA was partially supported by the grant No. 2G12MD007592 from the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS). We are grateful to the Biomolecule Analysis Core Facility (BACF) at UTEP/BBRC, funded by NIGMS grant No. 2G12MD007592, for the access to the LC-MS instrument.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all colleagues from Laboratório de Imunologia Celular & Bioquímica de fungos e protozoários (LICBfp), Departamento

de Ciências Farmacêuticas, UNIFESP who provided helpful technical advice and expertise that greatly assisted the research.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00099/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Size distribution of EVs from macrophages. Kinetics of released EVs isolated from THP-1 cells (differentiated to macrophages) infected or uninfected with *T. cruzi* and or treated with *T. cruzi* EVs. Supernatants from infected or not macrophages and from macrophages incubated with *T. cruzi* EVs were collected after 1, 6, and 24 h and then isolated by ultracentrifugation.

**Supplementary Table 1** | Proteins identified by LC-MS/MS in EVs derived from uninfected (THP-1) and infected (THP-1 infected) macrophages.

**Supplementary Table 2** | Table containing sequences of the primers selected for the gene expression analysis of human macrophages stimulated with EVs derived from infected or non-infected macrophages and infected with *T. cruzi* strain Y trypomastigotes.

## REFERENCES

- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942–949. doi: 10.1038/ni1496
- Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P., and Dimier-Poisson, I. (2004). Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect. Immun.* 72, 4127–4137. doi: 10.1128/IAI.72.7.4127-4137.2004
- Almeida, I. C., Camargo, M. M., Procópio, D. O., Silva, L. S., Mehler, A., Travassos, L. R., et al. (2000). Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 19, 1476–1485. doi: 10.1093/emboj/19.7.1476
- Andrews, N. W. (2002). Lysosomes and the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 158, 389–394. doi: 10.1083/jcb.200205110
- Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., and Olivier, M. (2015). Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Rep.* 13, 957–967. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.058
- Barbosa, F. M. C., Dupin, T. V., Toledo, M. D. S., Reis, N. F. D. C., Ribeiro, K., Cronemberger-Andrade, A., et al. (2018). Extracellular vesicles released by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promote disease progression and induce the production of different cytokines in macrophages and B-1 cells. *Front. Microbiol.* 9, 3056. doi: 10.3389/fmicb.2018.03056
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J., and Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 110, 3234–3244. doi: 10.1182/blood-2007-03-079152
- Burleigh, B. A., and Andrews, N. W. (1998). Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 461–465. doi: 10.1016/S1369-5274(98)80066-0
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Campos, F. M. F., Franklin, B. S., Teixeira-Carvalho, A., Filho, A. L. S., de Paula, S. C. O., Fontes, C. J., et al. (2010). Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar. J.* 9, 327. doi: 10.1186/1475-2875-9-327
- Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procópio, D. O., et al. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167, 416–423. doi: 10.4049/jimmunol.167.1.416
- Campos, M. A., Clossel, M., Valente, E. P., Cardoso, J. E., Akira, S., Alvarez-Leite, J. I., et al. (2004). Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 172, 1711–1718. doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1711
- Campos, M. A., and Gazzinelli, R. T. (2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm.* 13, 139–143. doi: 10.1080/09511920410001713565
- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., and Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.* 188, 1942–1952. doi: 10.4049/jimmunol.1102053
- Chowdhury, I. H., Koo, S.-J., Gupta, S., Liang, L. Y., Bahar, B., Silla, L., et al. (2017). Gene expression profiling and functional characterization of macrophages in response to circulating microparticles produced during *Trypanosoma cruzi* infection and chagas disease. *J. Innate Immun.* 9, 203–216. doi: 10.1159/000451055
- Coakley, G., Maizels, R. M., and Buck, A. H. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol.* 31, 477–489. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.009
- Cronemberger-Andrade, A., Aragão-França, L., de Araujo, C. F., Rocha, V. J., da Cruz Borges-Silva, M., Pereira Figueira, C., et al. (2014). Extracellular vesicles from *Leishmania*-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3161. doi: 10.1371/journal.pntd.0003161
- Curtin, J. F., Liu, N., Candolfi, M., Xiong, W., Assi, H., Yagiz, K., et al. (2009). HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med.* 6, e10. doi: 10.1371/journal.pmed.100010
- Delude, R. L., Yoshimura, A., Ingalls, R. R., and Golenbock, D. T. (1998). Construction of a lipopolysaccharide reporter cell line and its use in identifying mutants defective in endotoxin, but not TNF- $\alpha$ , signal transduction. *J. Immunol.* 161, 3001–3009.
- Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., et al. (2007). Human  $\delta$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18631–18635. doi: 10.1073/pnas.0702130104

- Gavinho, B., Rossi, I. V., Evans-Osses, I., Inal, J., and Ramirez, M. I. (2018). A new landscape of host-protozoa interactions involving the extracellular vesicles world. *Parasitology* 12, 1521–1530. doi: 10.1017/S0031182018001105
- Girard, M. C., Acevedo, G. R., López, L., Ossowski, M. S., Piñeyro, M. D., Grosso, J. P., et al. (2018). Evaluation of the immune response against *Trypanosoma cruzi* cytosolic trypanoxin peroxidase in human natural infection. *Immunology* 155, 367–378. doi: 10.1111/imm.12979
- Giri, P. K., Kruh, N. A., Dobos, K. M., and Schorey, J. S. (2010). Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics* 10, 3190–3202. doi: 10.1002/pmic.200900840
- Godsel, L. M., Tibbetts, R. S., Olson, C. L., Chaudoir, B. M., and Engman, D. M. (1995). Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2082–2085.
- Gonçalves, M. F., Umezawa, E. S., Katzin, A. M., de Souza, W., Alves, M. J., Zingales, B., et al. (1991). *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72, 43–53. doi: 10.1016/0014-4894(91)90119-H
- Hassani, K., and Olivier, M. (2013). Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2185. doi: 10.1371/journal.pntd.0002185
- He, B., You, L., Uematsu, K., Matsangou, M., Xu, Z., He, M., et al. (2003). Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 386–391. doi: 10.1016/S0006-291X(02)03071-1
- Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S., and Watowich, S. S. (2016). STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 31, 1–15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.001
- Hovsepian, E., Penas, F., Siffo, S., Mirkin, G. A., and Goren, N. B. (2013). IL-10 inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *PLoS ONE* 8:e79445. doi: 10.1371/journal.pone.0079445
- Hui, W. W., Hercik, K., Belsare, S., Alugubelly, N., Clapp, B., Rinaldi, C., et al. (2018). *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* alters the extracellular proteome of macrophages and leads to the production of proinflammatory exosomes. *Infect. Immun.* 86:e00386–e00317. doi: 10.1128/IAI.00386-17
- Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., et al. (2006). TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059–7066. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7059
- Kulkarni, M. M., Varikuti, S., Terrazas, C., Kimble, J. L., Satoskar, A. R., and McGwire, B. S. (2015). Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) plays a critical role in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 145, 225–231. doi: 10.1111/imm.12438
- Lässer, C., Alikhani, V. S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., et al. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J. Transl. Med.* 9. doi: 10.1186/1479-5876-9-9
- Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., et al. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* 274, 33419–33425. doi: 10.1074/jbc.274.47.33419
- Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Carregaro, V., Cunha, L. D., Silva, A. L. N., Mineo, T. W. P., et al. (2013). Inflammation-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat. Med.* 19, 909–915. doi: 10.1038/nm.3221
- Lobo, M., Balouz, V., Melli, L., Carlevaro, G., Cortina, M. E., Cámara, M., et al. (2019). Molecular and antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi* ToIT proteins. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13:e0007245. doi: 10.1371/journal.pntd.0007245
- Madison, M. N., Roller, R. J., and Okeoma, C. M. (2014). Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 11:102. doi: 10.1186/s12977-014-0102-z
- Maganto-García, E., Punzon, C., Terhorst, C., and Fresno, M. (2008). Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. *Traffic* 9, 1299–1315. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00760.x
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
- Marcilla, A., Martín-Jaular, L., Trellis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., et al. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J. Extracell. Vesicles* 3:25040. doi: 10.3402/jev.v3.25040
- Mathieu, M., Martín-Jaular, L., Lavie, G., and Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* 1, 9–17. doi: 10.1038/s41556-018-0250-9
- Mattos, E. C., Tonelli, R. R., Colli, W., and Alves, M. J. M. (2014). The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. *Subcell. Biochem.* 74, 151–180. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9\_7
- Moskowitz, N. H., Brown, D. R., and Reiner, S. L. (1997). Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infect. Immun.* 65, 2448–2450. doi: 10.1128/IAI.65.6.2448-2450.1997
- Nair, S., Pandey, A. D., and Mukhopadhyay, S. (2011). The PPE18 protein of mycobacterium tuberculosis inhibits NF- $\kappa$ B-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein. *J. Immunol.* 186, 5413–5424. doi: 10.4049/jimmunol.1000773
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., et al. (2015). Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J. Extracell. Vesicles* 4:28734. doi: 10.3402/jev.v4.28734
- Oliveira, A.-C., Peixoto, J. R., de Arruda, L. B., Campos, M. A., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T., et al. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycosylated phospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* 173, 5688–5696. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5688
- Petersen, C. A., Krumholz, K. A., and Burleigh, B. A. (2005). Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 $\beta$ -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 73, 6974–6980. doi: 10.1128/IAI.73.10.6974-6980.2005
- Pope, S. M., and Lässer, C. (2013). *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J. Extracell. Vesicles* 2:22484. doi: 10.3402/jev.v2i0.22484
- Quanquin, N. M., Galaviz, C., Fouts, D. L., Wrightsman, R. A., and Manning, J. E. (1999). Immunization of mice with a ToIA-like surface protein of *Trypanosoma cruzi* generates CD4(+) T-cell-dependent parasitocidal activity. *Infect. Immun.* 67, 4603–4612. doi: 10.1128/IAI.67.9.4603-4612.1999
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., et al. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cell. Microbiol.* 19:e12672. doi: 10.1111/cmi.12672
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138
- Regev-Rudzki, N., Wilson, D. W., Carvalho, T. G., Siqqella, X., Coleman, B. M., Rug, M., et al. (2013). Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* 153, 1120–1133. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.029
- Ribeiro, K. S., Vasconcelos, C. I., Soares, R. P., Mendes, M. T., Ellis, C. C., Aguilera-Flores, M., et al. (2018). Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J. Extracell. Vesicles* 7:1463779. doi: 10.1080/20013078.2018.1463779
- Rodríguez, A., Rioult, M. G., Ora, A., and Andrews, N. W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.* 129, 1263–1273. doi: 10.1083/jcb.129.5.1263
- Rossi, I. V., Gavinho, B., and Ramirez, M. I. (2019). Isolation and characterization of extracellular vesicles derived from *Trypanosoma cruzi*. *Methods Mol. Biol.* 89–104. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8\_7
- Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., and Colombo, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a Calcium-dependent mechanism in K562 Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 20083–20090. doi: 10.1074/jbc.M301642200
- Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D., and Horton, M. R. (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* 177, 1272–1281. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1272

- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., and Nussenzeig, V. (1991). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.* 2, 567–575. doi: 10.1084/jem.175.2.567
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Silva, J. S., Vespa, G. N., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C., and Cunha, F. Q. (1995). TNF- $\alpha$  mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* 63, 4862–4867. doi: 10.1128/IAI.63.12.4862-4867.1995
- Silverman, J. M., Clos, J., DeOliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., et al. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 123, 842–852. doi: 10.1242/jcs.056465
- Silverman, J. M., and Reiner, N. E. (2011). Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell. Microbiol.* 13, 1–9. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x
- Singh, P. P., Smith, V. L., Karakousis, P. C., and Schorey, J. S. (2012). Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 189, 777–785. doi: 10.4049/jimmunol.1103638
- Stahl, P., Ruppert, V., Meyer, T., Schmidt, J., Campos, M. A., Gazzinelli, R. T., et al. (2013). Trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce apoptosis and STAT3 activation in cardiomyocytes *in vitro*. *Apoptosis* 18, 653–663. doi: 10.1007/s10495-013-0822-x
- Street, J. M., Barran, P. E., Mackay, C. L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T. S., et al. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* 10, 5. doi: 10.1186/1479-5876-10-5
- Tardieux, I., Nathanson, M. H., and Andrews, N. W. (1994). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free  $Ca^{2+}$  transients. *J. Exp. Med.* 179, 1017–1022. doi: 10.1084/jem.179.3.1017
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E., et al. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71, 1117–1130. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80061-3
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593. doi: 10.1038/nri2567
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7:1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750
- Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579. doi: 10.1038/nri855
- Thomas, L. M., and Salter, R. D. (2010). Activation of macrophages by P2X7-induced microvesicles from myeloid cells is mediated by phospholipids and is partially dependent on TLR4. *J. Immunol.* 185, 3740–3749. doi: 10.4049/jimmunol.1001231
- Tkach, M., and Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell.* 6, 1226–1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043
- Torrecilhas, A. C., Schumacher, R. I., Alves, M. J. M., and Colli, W. (2012). Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect.* 14, 1465–1474. doi: 10.1016/j.micinf.2012.07.008
- Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., et al. (2009). *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect.* 11, 29–39. doi: 10.1016/j.micinf.2008.10.003
- Uphoff, C. C., and Drexler, H. G. (2002). Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38, 79–85. doi: 10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2
- Urményi, T. P., Silva, R., and Rondinelli, E. (2014). The heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Subcell. Biochem.* 74, 119–135. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9\_5
- van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125
- Wang, J., Yao, Y., Wu, J., and Li, G. (2015). Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 6135–6142.
- Wilkowsky, S. E., Barbieri, M. A., Stahl, P., and Isola, E. L. (2001). *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp. Cell Res.* 264, 211–218. doi: 10.1006/excr.2000.5123
- Wilkowsky, S. E., Wainszelbaum, M. J., and Isola, E. L. D. (1996). *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular  $Ca^{2+}$  during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 386–389. doi: 10.1006/bbrc.1996.0753
- Witwer, K. W., and Théry, C. (2019). Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J. Extracell. Vesicles.* 1:1648167. doi: 10.1080/20013078.2019.1648167
- Woolsey, A. M., Sunwoo, L., Petersen, C. A., Brachmann, S. M., Cantley, L. C., and Burleigh, B. A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell Sci.* 116, 3611–3622. doi: 10.1242/jcs.00666
- Wyllie, M. P., and Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathog. Dis.* 75. doi: 10.1093/femspd/ftx077
- Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 87–111. doi: 10.1590/S0001-37652006000100010
- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., et al. (2007). IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8, 967–974. doi: 10.1038/ni1488

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Cronemberger-Andrade, Xander, Soares, Pessoa, Campos, Ellis, Grajeda, Ofir-Birin, Almeida, Regev-Rudzki and Torrecilhas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 8.3. ANEXO III – ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO



#### **Neuro-COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome in children**

Journal:	<i>Developmental Medicine &amp; Child Neurology</i>
Manuscript ID	DMCN-OA-22-04-0256
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Apr-2022
Complete List of Authors:	Bentes, Aline; Universidade Federal de Minas Gerais, Pediatria; FHEMIG, Hospital Infantil João Paulo II dos Santos, Walter; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas, Microbiologia Pessoa, Natalia; Fundação Oswaldo Cruz Instituto René Rachou, Imunologia Diniz, Lilian; Universidade Federal de Minas Gerais, Pediatria Torres, Bruna; Hospital Infantil João Paulo II Teixeira, Daniela; Hospital Infantil João Paulo II, FHEMIG Campos, Marco; Fundação Oswaldo Cruz Instituto René Rachou, Imunologia Kroon, Erna; Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiology Drumond, Betania; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas, Microbiologia
Keywords:	COVID-19, neuro-COVID-19, COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome, SARS-CoV-2, MIS-C

## 8.4. ANEXO IV - OUTRAS ATIVIDADES

### PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICO

1. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. 2021.  
Pôster: "HEPATITIS IN A CHILD INFECTED WITH SARS-COV-2 PRESENTING TOLL-LIKE RECEPTOR 7 GLN11LEU SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM".
2. VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM 2021, 2021.  
Pôster: "DETECÇÃO DE SNP rs179008 Gln11Leu NO GENE *tlr-7* EM CRIANÇA INFECTADA COM SARS-CoV-2 COM HEPATITE".
3. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul. 2020.  
Pôsters: "DETECTION OF rs179008 SNP IN THE TLR7 GENE IN CHILDREN INFECTED WITH ZIKV WITH NEUROLOGICAL MANIFESTATIONS" e  
"DETECTION OF rs8177374 SNP IN THE TIRAP GENE IN CHILDREN INFECTED WITH DENV WITH NEUROLOGICAL MANIFESTATIONS".
4. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM 2020. 2020.
5. 55° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia Chagas Leish 2019.  
Pôster: "ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA CELULAR CONTRA ZIKA VIRUS EM MODELO IN VITRO E IN VIVO"
6. VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - CONECTA SIM 2019. O microbiologista no mercado de trabalho. 2019.  
Pôster: "REDUÇÃO NO GANHO DE PESO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DIFERENTES ISOLADOS BRASILEIROS DE ZIKA VIRUS"
7. IV FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA e São Paulo School of Advanced Science in Arbovirology FAMERP. São José do Rio Preto 2019.  
Pôsters: "REDUCTION ON WEIGHT GAIN IN MICE INFECTED WITH DIFFERENTIATES BRAZILIAN ISOLATES OF ZIKA VIRUS" e  
"STANDARDIZATION FOR DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs) IN INNATE IMMUNE RESPONSE GENES THROUGH qPCR: EVALUATION IN ZIKA VIRUS MENINGOENCEPHALITIS"
8. XXIX Congresso Brasileiro de Virologia & XIII Encontro de Virologia do Mercosul. 2018.  
Poster e apresentação oral: "MOLECULES OF INNATE IMMUNE RESPONSE AGAINST ZIKA VIRUS"

9. V Simpósio de Microbiologia da UFMG - Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas. 2018.

Pôster: “RESPOSTA IMUNE INATA CELULAR CONTRA ZIKA VIRUS EM MODELO MURINO”

10. XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia e XII Encontro de Virologia do Mercosul. 2017

Pôster: “IN VITRO CELLULAR INNATE IMMUNE RESPONSE AGAINST ZIKA VIRUS”.

11. III FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA e São Paulo School of Advanced Science in Arbovirology FAMERP. São José do Rio Preto – 2017.

Pôster: “CELLULAR IN VITRO INNATE IMMUNE RESPONSE AGAINST DENGUE VIRUS AND ZIKA VIRUS”

12. IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia. 2017.

Pôster: “IN VITRO CELLULAR INNATE IMMUNE RESPONSE AGAINST ZIKA VIRUS”

### **ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

1. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG. CONECTA SIM 2020. 2020.
2. IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia. 2017.

### **CURSOS**

1. “Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório”. Central de Bioterismo do Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. REBIOTERIO – CNPq. 2019.
2. São Paulo School of Advanced Science in Arbovirology - FAMERP - São José do Rio Preto. 2017.

### **OUTROS**

Integrante da equipe do laboratório de Vírus na Força tarefa de enfrentamento da pandemia de COVID-19, sob coordenação da Pró-reitoria de Pesquisa da UFMG – atuação na realização de testes moleculares dando suporte ao diagnóstico laboratorial de COVID-19.