



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Departamento de Biologia Celular–CEL  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – PPGBiomol

# **Modulação do perfil proteômico cerebral e da microbiota intestinal em camundongos imunocompetentes infectados pelo Zika vírus.**

**Rafael Corrêa**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Kelly Grace Magalhães**

Brasília

Dezembro, 2020



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas - IB  
Departamento de Biologia Celular–CEL  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – PPGBiomol

**Rafael Corrêa**

# **Modulação do perfil proteômico cerebral e da microbiota intestinal em camundongos imunocompetentes infectados pelo Zika vírus.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular,  
Para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Kelly Grace Magalhães**

Brasília  
Dezembro, 2020

Este trabalho é dedicado a você, familiar ou amigo, que contribuiu muito na minha caminhada. Em especial, dedico em memória do meu tio João Etelvino da Silva Pereira, que sempre me incentivou a estudar. Sem vocês esse sonho não seria possível.

“Hey! I'ma keep running

Cause a winner don't quit on themselves ...

I had my ups and downs

But I always find the inner strength to cool myself off

I was served lemons, but I made lemonade.”

Freedom - (Beyoncé Feat. Kendrick Lamar)

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela vida, pelos dons da ciência e sabedoria, por ter me concedido essa oportunidade de desfrutar desses momentos de formação e aprendizado, e por todo o seu amor incondicional. E a Nossa Senhora, mãe de Deus e também minha mãe, por ter sido colo nos momentos de sofrimentos, por ter sido proteção nos momentos de luta, e por sempre ter me amado e intercedido por mim.

A minha amiga e orientadora Kelly Magalhães, por ter me aceitado desde a Iniciação científica em 2011 até o doutorado. Por ter enxergado um potencial em mim, que nem eu sabia que tinha, por ter me ensinado absolutamente tudo sobre a carreira e a vida de cientista e pesquisador. Por termos compartilhados tantos momentos juntos, dos piores aos melhores e conquistado muitas coisas juntos. Obrigado por ser essa mulher extraordinária, por ser inspiração de vida, por ter sido não somente uma orientadora, mas também, uma mãe na ciência, amiga, e por todas as oportunidades que me proporcionou. Serei eternamente grato por tudo o que vivemos juntos.

A minha amiga Dalila Ribeiro, que foi um anjo durante esse doutorado e não me deixou desistir, pela ajuda durante as crises de ansiedade e depressão, por literalmente em diversos momentos me puxar pela mão e dizer “vamos trabalhar”. Serei eternamente grato, pois só nós sabemos o que passamos juntos nos nossos piores dias, espero em breve que possamos comemorar juntos todas as nossas conquistas e superações.

Aos meus amigos Igor Santos e Gabriel Pasquarelli, vocês foram meus irmãos e os melhores momentos desse doutorado, nós vivemos juntos, obrigado pelos lanches, passeios, treinos na academia, experimentos, companhia, conversas, risadas e por vocês serem essas pessoas maravilhosas que eu quero para sempre na minha vida.

A minha amiga Raquel Almeida, por ser minha companheira desde o primeiro dia em que pisamos na UnB, por todos os momentos compartilhados, por tudo o que aprendemos juntos um com o outro, por ter sido fonte de incentivo e inspiração para mim e por finalizamos essa etapa juntos. Já são 10 anos de amizade e companheirismo que eu espero que dure para sempre.

A minha amiga Heloísa Antoniella, por ser essa pessoa doce e paciente, pelas conversas e cafés, pela ajuda nos experimentos, e principalmente por ser um exemplo de superação e inspiração para todos nós. A minha amiga Isabela Cardoso, por ser uma das melhores Iniciações científicas que tive, aprendi muito com você, muito obrigado por toda a ajuda nos experimentos e na escrita, obrigado pelas conversas e momentos de fé que compartilhamos.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia e Inflamação - LIMI, Débora Santos, Luana Borges, Sabrina Azevedo, Milena Nascimento, Ana Júlia, Nathalia Soares, Gabriel Henrique, Gabriella Heyn, Gabriel Calixto, Gabriel Ribeiro, Augusto César, RamonBuson, Luiz Eduardo, Tiago Batista e José Assumpção, por todos os momentos e

aprendizados compartilhados, cada um de vocês deixou uma lembrança em mim e serei eternamente grato por ter tido vocês como segunda família.

A todos os meus colegas que passaram pelo LIMI e que me ajudaram nesse doutorado, Lívia Sant'Ana, Luís Henrique Corrêa, Ravena Maia, Victor Cardoso, Gabriel Freire, Lucas Brandão, Victória Machado, Carine, Junior, Lucinalva e Julia.

Aos meus bioamigos, Agnelo, Miguel e Família e Raffael Castro por serem os melhores amigos que a biologia poderia me conceder, obrigado por estarem junto comigo realizando este sonho. Obrigado a minha amiga Clênia Azevedo que também me acompanhou nessa jornada, por todas as conversas, cafés, conselhos e ajuda. Ao meu amigo Allan Mascarenhas por tantos aprendizados, conversas e risadas.

Ao Sr. Francisco Erivan (Chiquinho) por toda ajuda, suporte, conselhos e aprendizados nesse período. A Hero por sempre me recepcionar com um abraço e um sorriso e dizer que eu estava cheiroso, e por deixar o Laboratório e os banheiros limpos e cheirosos. Ao Weverton, Juliana e Jivago por todo suporte no biotério. Às secretárias do IB, em especial a Luciana e a Ana, por sempre resolverem e orientarem em todas as coisas burocráticas. Ao meu programa de pós-graduação Biologia Molecular, em especial aos professores Robert Miller, Sônia Freitas e Ricardo Kruger.

Aos meus amigos de ensino médio, Weslen Chagas e Família, Geisiane Lins, Diogo Vilela, Fabíula de Oliveira, Yuri Miguel, Nayara Brandão e Helen Neves. Aos meus amigos e presentes que a UnB me deu, Luís Felipe Fonseca, Gleice Borges, Thaís Amanda e família e Adrielle Veloso. À Ana Carolina Tavora e família. À Ana Gabriela Pinheiro e família. A minhas amigas Aline Silva, Deyse Nascimento, Isadora Costa e Família, Caroline Braga e família. Aos meus amigos do Laços da Alegria, Ana Cláudia Ribeiro (Nah), Ruan Athaíde e Gabriela Souza.

Aos meus amigos das Equipes Jovens de Nossa Senhora, em especial aos que foram da minha equipe, Beatriz Lino, Rayanne Roquete, Matheus Baesa, Raianne Leal, Sarah Vilela, Sarah Ferreira, Déborah Santos, Gabriela Amaral, Gabriela França, Karen Cristhine, Thiago Medeiros e Pedro Henrique. À Moacira e ao Elsion Goedert e ao Padre Luis Fernando. Aos meus Pilotos Marcelo Lucena e a Luciana Carvalho, a minha equipe de setor em especial a minha responsável de setor Ivania. A minha amiga e coordenadora de regional Andréa Marangoni e família. E a todas as pessoas que eu tive a oportunidade de conhecer, conviver, partilhar e amadurecer espiritualmente.

Aos meus amigos do Acampamento Maanaim, em especial aos que foram da minha tribo, Maxuel Rodrigues, Lorraine Nunes, Priscila Flores, Laís Nogueira, Ingrid Ulhoa, Ana Paula, Rosi Pacheco, Wanderson e Simone. À Sophia Baesa, Victória Cristina, Ana Maria, Paula Casseiro, Marcela Domenique, Iane Santos, Pedro, Ana Rosa, Raquel Guimarães e a todos que tive a oportunidade de conhecer, partilhar e viver momentos que marcaram minha vida para sempre.

Agradeço a minha psicóloga Walesca, minha psiquiatra Dr<sup>a</sup>Monara, meu personal Berg Brito e minha nutricionista Ingrid Ulhoa. Por todo suporte e ajuda para manter a saúde mental e física.

Por fim e os mais importantes, a minha família, meu pai Marcos Corrêa e minha mãe Lucineide Corrêa, por me gerarem e criarem com tanto amor, carinho, cuidado, educação, valores morais, éticos e respeito, por terem me mostrado que o conhecimento é umas das coisas mais importantes a serem conquistadas. A minha irmã e melhor amiga Isabela Corrêa por todas as vezes que cuidou de mim, me amou, me ouviu, me deu forças para seguir e foi para o lab. etiquetar meus tubinhos ou me fazer companhia. A meus animais de estimação Amy, Toddy e Ulisses por me mostrarem o amor da forma mais sincera e leal possível. Vocês todos são meu porto seguro, minha fortaleza, o bem mais precioso e valioso que eu possuo. E apesar das dificuldades, são a melhor família que eu poderia ter. Se eu cheguei até aqui foi graças a vocês, muito obrigado por todo incentivo, apoio, broncas, cuidado e amor. Eu os amo e farei tudo o que estiver ao meu alcance por vocês.

A todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas, obrigado por acreditarem em mim e me incentivarem, o apoio de vocês foi fundamental para chegar até aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter me concedido uma bolsa de doutorado e ter financiado parte do meu projeto.

Aos colaboradores desse projeto: Msc. Paulo Sousa Prado; Dr. Carlos Tauil; Dr. Rafael França; Dra. Aline Martins; Dr. Fábio Neves; Dr. Wagner Fontes; Dra. Corinne Maurice; Dr. Gary P. Kobinger e Dr. Hugh Willison.

A todos os camundongos que usei para desenvolver essa tese, sem a vida de vocês os resultados dessa tese não seriam possíveis.

A Universidade de Brasília por ter sido meu segundo lar, por ter me proporcionado tantos momentos e aprendizados, conhecido tantos lugares e pessoas, por ter aberto a minha mente para o mundo e por ser uma das melhores universidades do Brasil, sinto que não poderia ter escolhido lugar melhor para me formar, como bacharel e licenciado, mestre e doutor.

<b>Sumário</b>	
<b>Agradecimentos</b> .....	5
<b>Resumo</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	12
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	13
<b>Lista de Figuras e Tabelas</b> .....	16
<b>1. Introdução</b> .....	18
1.1. Zika Vírus.....	18
1.2. Histórico e Epidemiologia.....	20
1.3. Transmissão.....	22
1.4. Manifestações Clínicas.....	24
1.5. Tropismo celular do ZIKV .....	25
1.6. Receptores celulares.....	27
1.8. Resposta Imune Inata ao ZIKV .....	30
1.9. Inflamassoma .....	36
1.10. Resposta imune adaptativa ao ZIKV .....	39
1.11. Microbiota .....	42
<b>2. Justificativa</b> .....	45
<b>3. Objetivos</b> .....	47
3.1. Geral:.....	47
3.2. Específicos: .....	47
<b>4. Metodologia</b> .....	48
4.1. Animais e Comitê de Ética.....	48
4.2. Linhagens celulares utilizadas.....	48
4.3. Expansão do Zika Vírus .....	48
4.4. Titulação do Zika Vírus.....	49
4.5. Infecções <i>In vivo</i> .....	49
4.6. Carga viral por RT-PCR.....	49
4.6.1. Extração de RNA .....	49
4.6.2. RT-PCR.....	50
4.7. Extração de Proteínas .....	51
4.8. Dosagem de Citocinas ELISA.....	51
4.9. Histologia .....	52
4.10. Citometria.....	52
4.11. Análise da microbiota intestinal .....	53
4.11.1. Isolamento de DNA de amostras fecais .....	53
4.11.2. Amplificação do DNAr 16s por PCR.....	54



4.11.3.	Sequenciamento por Illumina (V4) .....	54
4.11.4.	Análise filogenética.....	54
4.12.	Análise de Proteômica.....	54
4.12.1.	Preparo da amostra.....	54
4.12.2.	Cromatografia e espectrometria de massa.....	55
4.12.3.	Análise de dados.....	55
4.13.	Análise Estatística .....	56
<b>5.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>57</b>
5.1.	A infecção pelo ZIKV alterou a $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes.....	57
5.2.	A infecção pelo ZIKV diminuiu a abundância dos filos Actinobacteria e Firmicutes da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes .....	59
5.3.	A infecção pelo ZIKV aumentou a abundância das famílias Deferribacteraceae e Spirochaetaceae na microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes.....	61
5.4.	A modulação da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV leva a um recrutamento de leucócitos para o cólon dos camundongos selvagens imunocompetentes....	64
5.5.	A infecção por ZIKV não alterou o peso e a glicemia de camundongos selvagens imunocompetentes, independente da presença de NLRP3 e Caspases-1/11 .....	66
5.6.	A infecção por ZIKV induziu uma diminuição da presença de TNF- $\alpha$ e IL-10 no soro dos camundongos selvagens e nocautes para a proteína NLRP3 .....	68
5.7.	Não foi detectado aumento de tamanho e peso do baço em camundongos selvagens e nocautes após a infecção por ZIKV .....	70
5.8.	Não foi detectado aumento da presença de macrófagos no baço de camundongos selvagens e nocautes após a infecção por ZIKV .....	72
5.9.	A infecção por ZIKV não induziu aumento da presença de linfócitos T CD4+ no baço de camundongos selvagens imunocompetentes e nem nos camundongos nocautes .....	74
5.10.	A infecção por ZIKV não induziu aumento da presença de linfócitos T CD8+ no baço de camundongos selvagens imunocompetentes, mas induziu em animais nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 .....	76
5.11.	A infecção por ZIKV não modulou a presença de linfócitos T CD4+ que secretam IFN- $\gamma$ no baço de camundongos selvagens imunocompetentes e nem nos camundongos nocautes .....	78
5.12.	A infecção por ZIKV induziu uma diminuição na expressão de MHC-II em esplenócitos de camundongos selvagens imunocompetentes.....	80
5.13.	A infecção por ZIKV não modulou a expressão de CD1d em esplenócitos de camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes .....	82
5.14.	A infecção por ZIKV induz um aumento na biogênese de Corpúsculos lipídicos em esplenócitos de camundongos selvagens imunocompetentes.....	84
5.15.	Não foi detectado alteração no peso e no tamanho do cérebro em camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes após a infecção por ZIKV .....	86
5.16.	A infecção por ZIKV não induz danos histopatológicos no cérebro em camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes .....	87

5.17.	A infecção por ZIKV não induz modulação na secreção de citocinas no cérebro em camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes .....	89
5.18.	A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos selvagens imunocompetentes .....	90
5.19.	A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro dependente do NLRP3 .....	93
5.20.	A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro dependente das Caspases-1/11 .....	95
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>143</b>
I.	Comitê de ética para uso de animais: .....	143
II.	Publicações relacionadas a tese de Doutorado: .....	144
III.	Demais publicações:.....	148

## Resumo

### **Modulação do perfil proteômico cerebral e da microbiota intestinal em camundongos imunocompetentes infectados pelo Zika vírus.**

O vírus Zika (ZIKV), um arbovírus da família Flaviviridae, causou recentemente um surto no Brasil e levou ao desenvolvimento de desordens neurológicas pós-infecção, tais como microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré. Devido a esse fato, diversos modelos animais foram amplamente utilizados para melhor elucidar a patogênese e diferentes tropismos associados ao ZIKV. Dentre esses modelos, o uso de camundongos imunocompetentes tem um papel central devido a sua semelhança com a resposta antiviral desenvolvida em humanos. O ZIKV pode infectar camundongos imunocompetentes adultos e desencadear danos à resposta antiviral do hospedeiro. Um dos mecanismos utilizados pelo ZIKV para a evasão da resposta imune é através da ativação do inflamassoma NLRP3 e da caspase-1 *in vitro*. O inflamassoma NLRP3 possui um papel dúbio na regulação da homeostase da microbiota intestinal e essa pode modular a função neuroendócrina, inflamação e respostas celulares e imunológicas contra diferentes patógenos, incluindo vírus. No entanto, não se sabe se a infecção pelo ZIKV pode impactar a microbiota intestinal e qual seria o papel do inflamassoma NLRP3 e das Caspases-1/11 na infecção por ZIKV em modelos murinos. Sendo assim, investigamos se o ZIKV induz uma modulação na microbiota intestinal, avaliamos os efeitos dessa modulação nos camundongos selvagens adultos imunocompetentes e caracterizamos a patogênese do ZIKV nesses camundongos e nos camundongos nocautes para as proteínas caspases-1/11 e NLRP3. Após infectar camundongos adultos selvagens (C57BL/6J), a microbiota intestinal das fezes foi caracterizada pela extração e sequenciamento do DNA 16S. Nossos dados mostraram que a infecção por ZIKV desencadeou diminuição significativa nas bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria e Firmicutes, e induziu aumento dos componentes dos filos Deferribacteres e Spirochaetes em comparação com camundongos não-infectados. Essa modulação da microbiota induzida pela infecção pelo ZIKV pode causar dano ao epitélio intestinal e intenso recrutamento de leucócitos para a mucosa intestinal. Além disso, caracterizamos os efeitos pós infecção do ZIKV no cérebro de camundongos adultos imunocompetentes selvagens e nocautes e descobrimos que, embora a infecção por ZIKV não cause uma modulação no tamanho, peso, carga viral, secreção de citocinas e danos histopatológicos, há uma modulação do perfil e abundância de proteínas cerebrais em resposta a uma infecção tardia por ZIKV, tanto em camundongos selvagens quanto em camundongos nocautes. Em conclusão esta tese mostrou pela primeira vez a capacidade do ZIKV de modular a microbiota intestinal em camundongos adultos imunocompetentes e alterar o perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos selvagens e nocautes, demonstrando o papel das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 nesse contexto.

**Palavras Chaves:** ZIKV, camundongos imunocompetentes, microbiota intestinal, cérebro, NLRP3, Caspases-1/11

## Abstract

### **Modulation of proteomic profile brain and the gut microbiota in immunocompetent mice infected with the Zika virus.**

The Zika virus (ZIKV), an arbovirus of the Flaviviridae family, recently caused an outbreak in Brazil and led to the development of post-infection neurological disorders, such as microcephaly and Guillain-Barre syndrome. Due to this fact, several animal models have been widely used to better elucidate the pathogenesis and different tropisms associated with ZIKV. Among these models, the use of immunocompetent mice plays a central role due to their similarity to the antiviral response developed in humans. ZIKV can infect adult immunocompetent mice and trigger damage to the host's antiviral response. One of the mechanisms used by ZIKV to evade the immune response is through the activation of the NLRP3 inflammasome and caspase-1 *in vitro*. NLRP3 inflammasome has a dubious role in the regulation of intestinal microbiota homeostasis and can modulate neuroendocrine function, inflammation and cellular and immunological responses against different pathogens, including viruses. However, whether ZIKV infection can affect the gut microbiota of adult immunocompetent mice is not known, and which would be the role of NLRP3 inflammasome and Caspases-1/11 in the pathogenesis of ZIKV infection in murine models. Therefore, we investigated whether ZIKV induces a modulation in the gut microbiota and what the effects of this modulation are in the immunocompetent adult wild-type mice and characterize the pathogenesis of ZIKV in these mice and the knockout mice for caspase-1/11 and NLRP3 proteins. After infected wild-type adult mice (C57BL/6J), the gut microbiota was characterized by the extraction and sequencing of DNA 16S by feces. Our data showed that ZIKV infection triggered significant decrease in bacteria belonging to the phyla Actinobacteria and Firmicutes, and induced increase in the components of the phyla Deferribacteres and Spirochaetes compared to uninfected mice. This modulation of the microbiota induced by ZIKV infection can cause damage to the intestinal epithelium and intense recruitment of leukocytes to the intestinal mucosa. Also, we characterized the post-infection effects of ZIKV in the brain of adult immunocompetent wild-type mice and knockout mice. Although ZIKV infection does not cause a modulation in size, weight, viral load, cytokine secretion, and histopathological damage, there is a profile modulation and abundance of brain proteins in response to late ZIKV infection, both in wild type and knockout mice. In conclusion, this thesis showed for the first time the ability of ZIKV to modulate the intestinal microbiota in adult immunocompetent mice and to alter the profile and abundance of proteins in the brain of wild and knockout mice, demonstrating the role of NLRP3 and Caspases-1/11 proteins in this context.

## Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius  
Å – ångström  
ADE – Potencialização dependente de anticorpos  
AIM2 – Proteína ausente no melanoma 2  
Akt-mTor – Via de sinalização intracelular importante na regulação do ciclo celular  
AMP – Adenosina 3',5'-monofosfato  
APC – Aloficocianina  
APCs – Células apresentadoras de Antígenos  
ASC – Proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD  
ATP – Adenosina trifosfato  
BIR – domínio inibidor de baculovírus  
BMDCs – Células dendríticas derivadas de medula óssea  
BMDMs – Macrófagos derivados de medula óssea  
BSA – Albumina sérica bovina  
CARDs – Domínios de ativação e recrutamento de caspases  
CASK – Proteína serina quinase dependente de cálcio/calmodulina  
CASKIN1 – Proteína 1 que interage com a CASK  
Casp1/11<sup>-/-</sup> – Caspases1/11 nocautes  
CCL5 – Ligante 5 de quimiocina CC  
CD – Cluster de diferenciação  
CDC – Centro de controle e prevenção de Doenças  
cGAS – GMP-AMP sintase cíclica  
CHI3L1 – Proteína 1 do tipo quitinase-3  
CID – Dissociação induzida por colisão  
CL – Corpúsculos lipídicos  
CMC – Carboximetilcelulose  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico  
Ct – Ciclo limiar  
CXCL10 – Ligante 10 de quimiocina CXC  
DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Perigo  
DC-SIGN – Molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas  
DDA – Aquisição dependente de dados  
DDT – Dopacromo Tautomerase  
DENV – Dengue vírus  
DEXD/H Box – Domínio de helicase de RNA com atividade ATPase  
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
dpi – dias pós infecção  
DTT – Ditioneitol  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
g – Força G  
g – Grama  
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
GDP – Guanosina difosfato  
GMP – Guanosina monofosfato  
GSDMD – Gasdermina D  
GTP – Guanosina trifosfato  
h – Hora  
HAVcr-1 – Receptor celular do vírus da hepatite A 1  
HE – Hematoxilina & Eosina

**Hsp60** – Proteína de choque térmico 60  
**i.p** – Intraperitoneal  
**i.v** – Intravenoso  
**IFN** – Interferon  
**IFNAR** – Receptor IFN- $\alpha/\beta$   
**Ig** – Imunoglobulina  
**IL** – Interleucina  
**iNOS** – Óxido nítrico sintase induzida  
**IRF** – Fator Regulador de Interferon  
**ISGs** – Genes Estimulados por Interferon  
**JAK1** – Janus quinase 1  
**kg** – Quilogramas  
**LACEN-DF** – Laboratório Central do Distrito Federal  
**LRRs** – repetições ricas em leucina  
**M1** – Macrófagos ativados classicamente  
**M2** – Macrófagos ativados alternativamente  
**MAVS** – Proteína adaptadora de sinalização antiviral mitocondrial  
**MCP-1** – Proteína quimioatraente de monócitos 1  
**MDA5** – Proteína 5 associada a diferenciação de melanoma  
**mg** – Miligramas  
**MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade  
**MIF-2** – Fator de inibição da migração de macrófagos 2  
**min.** – Minuto  
**mm** – Milímetros  
**mol/L** – Molaridade por litro  
**mRNA** – RNA mensageiro  
**MS** – Espectrometria de massas  
**MTase** – Domínio metiltransferase N-terminal  
**mtDNA** – Ácido desoxirribonucleico mitocondrial  
**MyD88** – Proteínas Adaptadora de diferenciação mieloide 88  
**N** – Número experimental  
**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B  
**NI** – Não Infectado  
**NK** – Células exterminadoras naturais  
**NLRP3** – Proteína 3 contendo domínios NACHT, LRR e PYD  
**NLRP3<sup>-/-</sup>** – NLRP3 nocaute  
**NLRs** – Receptores do tipo NOD  
**nm** – Nanômetro  
**NPCs** – Células precursoras neurais  
**NS** – Proteínas não estruturais  
**NTase** – Enzimas nucleotidiltransferase  
**NV** – Nervo vago  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**PALS** – bainhas linfoides periarteriolares  
**PAMPs** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos  
**PBMCs** – Células mononucleares do sangue periférico  
**PBS** – Solução Salina  
**PCA** – Análise dos principais componentes  
**PCs** – Coordenadas principais  
**PE** – Ficoeritrina  
**PFU** – Unidades formadoras de placas

**pg** – picograma  
**pH** - Potencial Hidrogeniônico  
**prM** – Proteína precursora de membrana  
**PRRs** – Receptores de Reconhecimento Padrão  
**PYD** – domínio pirina  
**RD** – Domínio repressor C-terminal  
**RdRp** – RNA polimerase dependente do domínio RNA C-terminal  
**RegIII $\gamma$**  – Proteína III-gama derivada de ilhotas em regeneração  
**RER** – Retículo Endoplasmático Rugoso  
**RIG-1** – Gene 1 induzido por ácido retinóico  
**RLRs** – Receptores semelhantes ao gene I induzido por ácido retinóico  
**RNASS+** – Ácido Ribonucleico de cadeia simples de sentido positivo  
**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio  
**rpm** – Rotações por minuto  
**RT-PCR** – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase  
**SCFAs** – Ácidos graxos de cadeia curta  
**SCZ** – Síndrome congênita do Zika vírus  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**seg.** – Segundo  
**SFB** – Soro Fetal Bovino  
**SGB** – Síndrome de Guillain-Barré  
**SNA** – Sistema nervoso autônomo  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**SNE** – Sistema nervoso entérico  
**STAT** – Família de proteínas transdutores de sinal e ativador da transcrição  
**STING** – Proteína estimuladora de genes de interferon  
**TAM** – TYRO-3, AXL e MER  
**TBK1** – Quinase 1 de ligação a TANK  
**TEA** – Transtorno do espectro do autismo  
**TEAB** – Brometo de tetraetilamônio  
**TGF $\beta$**  – Fator de transformação do crescimento beta  
**TGI** – Trato gastrointestinal  
**TGN** – Rede Trans-Golgi  
**TIM** – Imunoglobulina de células T e proteína 1 de domínio de mucina  
**TLR** – Receptores do Tipo Toll  
**TNF $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa  
**TRIF** – Adaptador contendo o domínio TIR indutor de Interferon- $\beta$   
**TYK2** – Tirosina quinase 2  
**V** – Volts  
**VIP-Score** – Pontuações de projeção de importância variável  
**VPs** – Pacotes de Vesículas  
**WNV** – Vírus do Nilo Ocidental  
**WT** – Selvagem  
**YFV** – Vírus da Febre Amarela  
**ZIKV** – Zika vírus  
 **$\mu$ L** – Microlitros  
 **$\mu$ M** – Micrometro

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 - A estrutura do ZIKA Vírus. ....	20
Figura 2 - Dispersão do ZIKA Vírus. ....	22
Figura 3 - Tropismo celular e tecidual do ZIKV. ....	27
Figura 4 - Receptores e ciclo celular do ZIKV. ....	29
Figura 5 - Inibição mediada pelo ZIKV das vias de sinalização que levam à indução de interferon tipo I (IFN-I) e genes estimulados por IFN (ISGs). ....	34
Figura 6 - Mecanismo de ativação do inflamassoma NLRP3 e inibição da sinalização de IFN-I mediada pelo ZIKV. ....	39
Figura 7 - Estratégias de gate e análises de citometria. ....	53
Figura 8 - O ZIKV induz uma modulação na $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes. ....	58
Figura 9 - Análise da diversidade de filós bacterianos da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes. ....	60
Figura 10 - Análise da diversidade de filós bacterianos da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes. ....	62
Figura 11 - A modulação da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV causa dano ao epitélio intestinal e recrutamento de leucócitos para a lâmina própria de camundongos selvagens imunocompetentes. ....	65
Figura 12 - A infecção por ZIKV não altera a carga viral, peso e glicemia em camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> . ....	67
Figura 13 - Análise de citocinas séricas em camundongos selvagens Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> após a infecção por ZIKV. ....	69
Figura 14 - A infecção por ZIKV não induziu esplenomegalia no baço de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> . ....	71
Figura 15 - Análise da presença de macrófagos no baço de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por ZIKV. ....	73
Figura 16 - Análise da presença de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> no baço de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por ZIKV. ....	75
Figura 17 - Análise da presença de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no baço de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por ZIKV. ....	77
Figura 18 - Análise da presença de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no baço de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por ZIKV. ....	79
Figura 19 - Diminuição da expressão de MHC-II em esplenócitos de camundongos selvagens infectados por ZIKV independente da presença das Caspases1/11. ....	81
Figura 20 - Análise da expressão de CD1d em esplenócitos de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por ZIKV. ....	83
Figura 21 - Aumento da biogênese de Corpúsculos lipídicos nos esplenócitos de camundongos selvagens infectados por ZIKV dependente da presença de NLRP3. ....	85
Figura 22 - A infecção por ZIKV não altera o peso e tamanho dos cérebros de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> . ....	86
Figura 23 - A infecção por ZIKV não induz danos histopatológicos nos cérebros dos camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> . ....	88
Figura 24 - Análise de citocinas no cérebro de camundongos selvagens, Casp1/11 <sup>-/-</sup> e NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por ZIKV. ....	89
Figura 25 - A infecção por ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos selvagens imunocompetentes. ....	92
Figura 26 - A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos NLRP3 <sup>-/-</sup> . ....	94
Figura 27 - A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos Casp1/11 <sup>-/-</sup> . ....	99



<b>Tabela 1 - Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.</b> .....	51
<b>Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cDNA para amplificação dos fragmentos do gene do envelope do ZIKV.</b> .....	51
<b>Tabela 3 - Modulação da abundância das famílias bacterianas desencadeada pela infecção pelo ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes.</b> .....	63

# 1. Introdução

## 1.1. Zika Vírus

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus* (Kuno et al., 1998). O vírus recebeu essa denominação devido ao local de origem de sua identificação ocorrida em macacos na floresta Zika, em Uganda, na África, em 1947 (Dick, 1952). O ZIKV é um vírus envelopado que possui um genoma de RNA de cadeia simples de sentido positivo (RNA SS+) com de cerca de 11 kilobases, que é traduzido em uma única poli proteína dividida em três proteínas estruturais (membrana, envelope e capsídeo) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1) (Kuno and Chang, 2007).

As três proteínas estruturais do ZIKV, como o próprio nome já diz, compõem a estrutura do vírus. A proteína do capsídeo (C) é a responsável pela formação do nucleocapsídeo viral (Ma et al., 2004). A proteína precursora de membrana (prM) tem como principais funções a formação do capsídeo viral, a fusão com células hospedeiras e a estabilização da estrutura viral (Lindenbach and Rice, 2003). Já a proteína do envelope (E) é responsável pela entrada do vírus na célula, interação com receptores das células do hospedeiro, fusão da bicamada lipídica do vírus com a membrana da vesícula endossômica e dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (Kuhn et al., 2002; Faye et al., 2014; Hamel et al., 2015).

Dentre as proteínas não estruturais, a proteína não estrutural 1 (NS1) é uma proteína extremamente preservada em Flavivírus com peso molecular de 46-55 kDa e cerca de 342aa de comprimento, e sua função depende do nível de glicosilação. A glicosilação da NS1 é importante para emissão, virulência e replicação do vírus (Pryor and Wright, 1994; Crabtree et al., 2005). A proteína NS1 glicosilada forma um homodímero no interior das células que é necessário para a replicação e infecção viral (Mackenzie et al., 1996). A NS1 também pode ser secretada no espaço extracelular como uma partícula de lipoproteína hexamérica (sNS1), que está envolvida na evasão imune e na patogênese (Young et al., 2000).

A Proteína NS1 é considerada o principal marcador antigênico de infecções pelo vírus da Dengue (DENV) (Young et al., 2000). Os mecanismos moleculares da patogênese do NS1 são relativamente bem estabelecidos para DENV, e por isso acredita-se que a sequência de codificação da NS1 seja um fator genético determinante para as diversas consequências clínicas de infecções causadas por Flavivírus (Akey et al., 2014; Edeling et al., 2014). Estudos com a proteína NS1 de ZIKV revelaram que essa exibe uma interface com potencial eletrostático divergente, podendo ter propriedades de ligação alteradas para fatores do hospedeiro e anticorpos protetores de outras proteínas NS1 virais (Song et al., 2016). As características únicas da superfície da proteína NS1 do ZIKV podem estar relacionadas ao neurotropismo do ZIKV e podem ajudar o vírus a atravessar as diversas barreiras corporais (Shi and Gao, 2017). Além disso, a proteína NS1 do ZIKV é alvo no desenvolvimento de novas

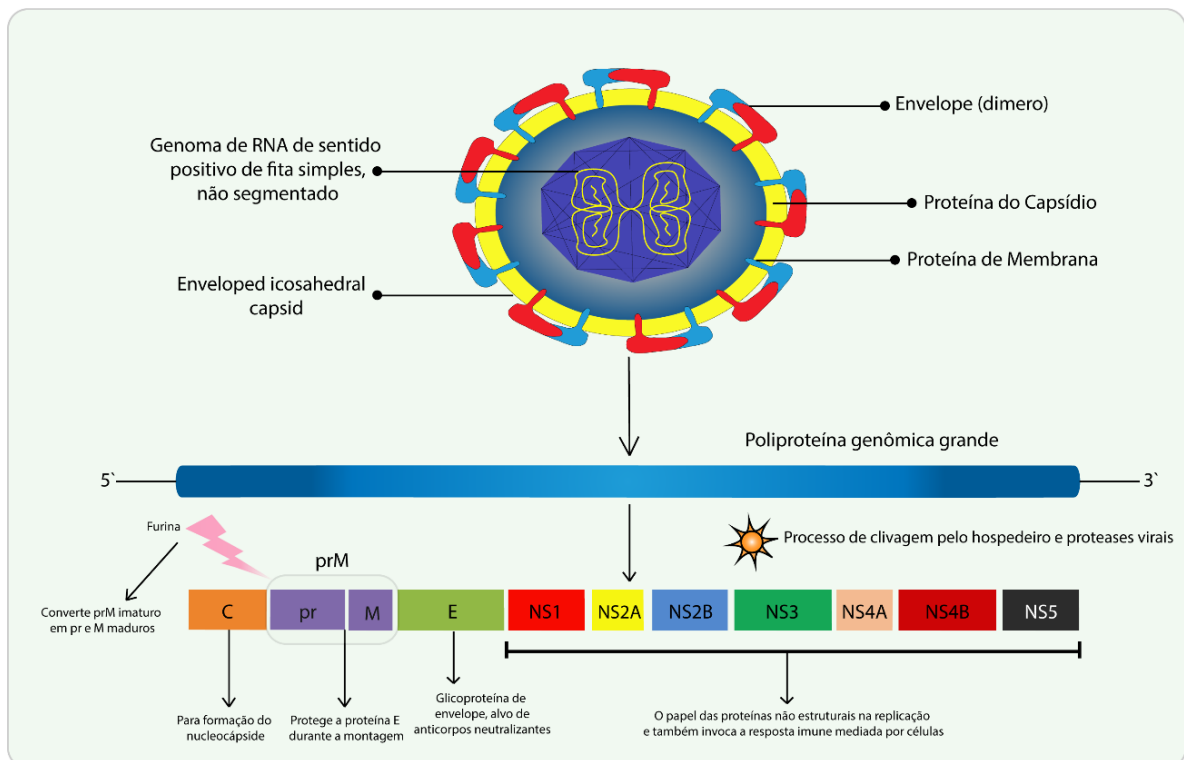
ferramentas terapêuticas e de diagnóstico para a infecção pelo ZIKV (Stettler et al., 2016).

A proteína não estrutural 2A (NS2A) é uma proteína envolvida na replicação do RNA viral e na montagem do vírion (Zhang et al., 2019). Já a proteína não estrutural 2B (NS2B), essa tem como principal função ser cofator ao se associar com a proteína não estrutural 3 (NS3). A NS3 possui dois domínios funcionais: um domínio de protease e um domínio de helicase e, ao se unir com a NS2B, formam um complexo protease envolvido na clivagem de poli proteínas (Phoo et al., 2016). Devido à sua importante função, a protease viral formada por NS2B/NS3 é um atraente alvo para a produção de fármacos antivirais (Lei et al., 2016).

A proteína não estrutural 4A (NS4A), no ZIKV, serve como fator determinante da patogênese do vírus através da modulação de vias da resposta antiviral celular (Ma et al., 2018). A proteína não estrutural 4B (NS4B) é uma proteína pouco conservada, que constitui a membrana do complexo de replicação viral e está envolvida no direcionamento da proteína NS3 na membrana (Buckley and Gould, 1988). Além disso, já se sabe que, juntas, a NS4A e a NS4B do ZIKV suprimem cooperativamente a via Akt-mTOR em células-tronco fetais humanas neurais inibindo a neurogênese e induzindo a autofagia (Liang et al., 2016).

A maior proteína não estrutural do ZIKV é a proteína não estrutural 5 (NS5) que é composta por dois domínios, ambos essenciais para replicação do genoma: o domínio metiltransferase N-terminal (MTase), responsável pela estrutura de 5' cap do genoma viral, que garante tradução e evasão estáveis e eficientes da resposta imune do hospedeiro; e a RNA polimerase dependente do domínio RNA C-terminal (RdRp), responsável pelo processo de replicação do genoma do RNA (Godoy et al., 2017; Wang et al., 2017a; Zhao et al., 2017). Além da sua função enzimática, a NS5 do ZIKV regula diferencialmente a sinalização de interferon (IFN), interagindo e promovendo a degradação de STAT2 em células infectadas (Chaudhary et al., 2017). A importância do NS5 na replicação viral e na modulação da resposta imune do hospedeiro a torna um alvo atraente para o desenvolvimento de inibidores antivirais de ampla ação (Shi and Gao, 2017).

O primeiro estudo filogenético do ZIKV foi feito com base no sequenciamento da região completa do gene codificador da proteína NS5 que revelou três linhagens ou subclados diferentes do ZIKV: África Oriental (protótipo Uganda), África Ocidental (linhagens do Senegal) e Ásia (ZIKV Estirpe Yap de 2007) (Lanciotti et al., 2008). O genoma do ZIKV mostrou uma incrível variação de sequências nucleotídicas da NS5 e uma nova análise filogenética revelou que as cepas de ZIKV que circulam na América Latina são homólogas e constituem um novo clado americano dentro da linhagem asiática (Ye et al., 2016). Com isso, uma série de variações de aminoácidos conservados entre a linhagem asiática em circulação e a linhagem africana foram identificadas e podem contribuir para o aprimoramento da patogenicidade e a eficiência da transmissão do ZIKV (Lanciotti et al., 2016).



**Figura 1 - A estrutura do ZIKA Vírus.** O Zika é um vírus composto de RNA simples de sentido positivo, envelope, capsídeo e proteína de membrana. A parte inferior representa a poliproteína que é clivada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E), e membrana (prM) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: (Almeida et al., 2020).

## 1.2. Histórico e Epidemiologia

A descoberta do ZIKV e de muitos outros arbovírus foi o resultado de programas de pesquisa sobre o vírus da febre amarela (YFV) patrocinados pela Fundação Rockefeller de 1914 a 1970 (Dick, 1953). Em abril de 1947, um dos macacos Rhesus de um experimento na floresta Zika em Uganda apresentou uma febre de 39,7°C. Os sintomas foram avaliados e o sangue coletado para a identificação do agente etiológico que foi isolado do macaco e referido como ZIKV. Este agente foi neutralizado por soro de fase convalescente retirado do macaco um mês após o episódio febril. Em Janeiro de 1948, o ZIKV foi isolado com sucesso de um mosquito chamado *Aedes africanus* (Dick, 1952).

O primeiro isolado humano de ZIKV veio de uma paciente nigeriana de 10 anos em 1954 (MacNamara, 1954). O ZIKV foi isolado em camundongos inoculados com o soro dessa paciente. O diagnóstico da apresentação clínica da paciente foi difícil, visto que o sangue desta também continha numerosos parasitas da malária. Os outros dois casos humanos de infecção por ZIKV também foram relatados em 1954 na Nigéria e foram confirmados por um aumento de anticorpos neutralizantes séricos (MacNamara, 1954). Fora da África, o ZIKV foi isolado pela primeira vez de mosquitos *Aedes aegypti* somente em 1969 na Malásia (Marchette et al., 1969). Posteriormente, as primeiras infecções humanas foram relatadas no centro

de Java, na Indonésia, em 1977 (Olson et al., 1981). Entretanto, mais tarde, descobriu-se que o ZIKV causou infecções esporádicas em humanos em diversas partes da África e da Ásia, em virtude da presença de anticorpos virais que foram detectados em pessoas saudáveis no Paquistão, Índia e Egito (SMITHBURN et al., 1954a, 1954b; Darwish et al., 1983).

Em 2007, foi relatado um surto de ZIKV na Ilha Yap, que é um dos quatro estados que fazem parte dos Estados Federados da Micronésia, na qual cerca de 75% da população foi infectada dentro de 4 meses (Duffy et al., 2009). Essa foi a primeira detecção de ZIKV fora da Ásia e da África e o primeiro grande surto de ZIKV já registrado. Antes desse surto, apenas 14 infecções humanas haviam sido relatadas (Faye et al., 2014). Esse surto destacou o potencial do ZIKV como um arbovírus recém-emergente.

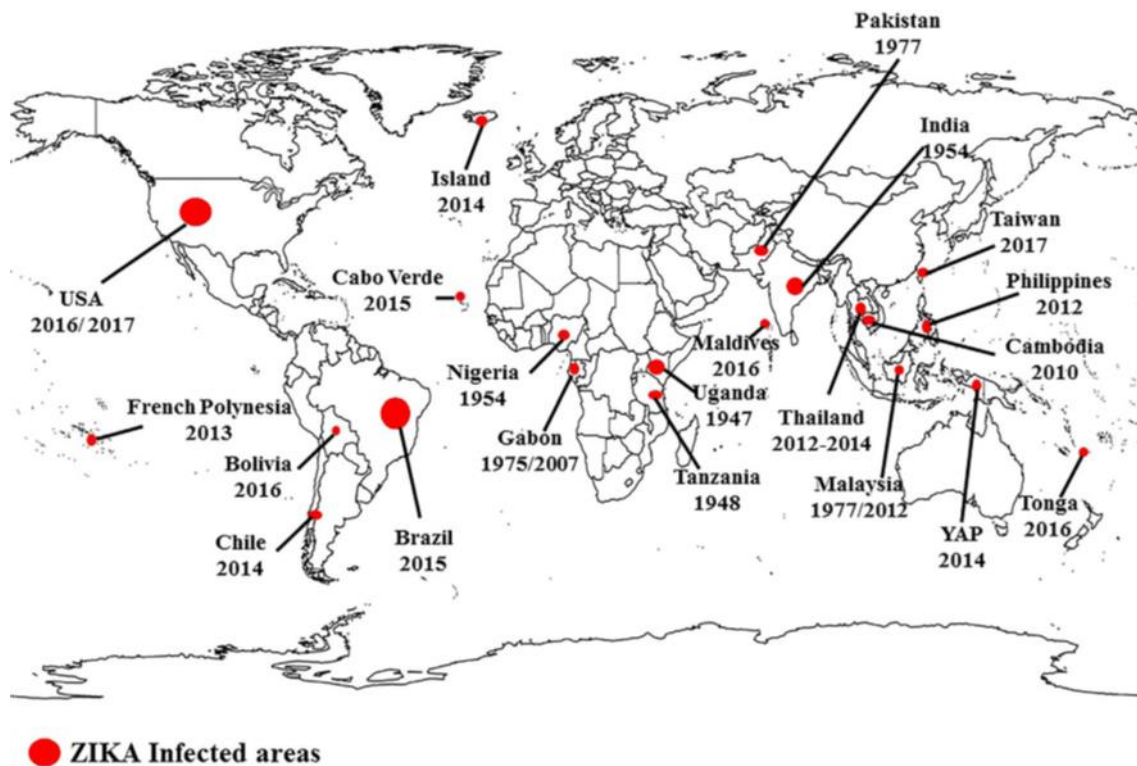
Em 2012, um surto de ZIKV ocorreu nas Filipinas (Alera et al., 2015) e, logo em seguida, na Tailândia de 2012 a 2014 (Buathong et al., 2015). Em 2013, o surto de ZIKV foi na Polinésia Francesa e, desta vez, o ZIKV causou infecções graves, acompanhado de uma epidemia de dengue. Esse surto de ZIKV teve como alvo aproximadamente 29.000 pessoas, sendo que 72 casos mostraram sintomas graves (Cao-Lormeau, 2014; Oehler et al., 2014). Depois dessa epidemia, o ZIKV se espalhou para algumas outras ilhas do Oceano pacífico como Nova Caledônia, Vanuatu, Ilhas Cook e Ilhas Salomão (Derraik and Slaney, 2015). Então no início de 2014, o primeiro surto autóctone com cinquenta e um casos foi relatado na Ilha de Páscoa (Tognarelli et al., 2016).

No Brasil, desde o final de 2014, com pico em fevereiro de 2015, um surto de “doença exantemática” afetou milhares de pacientes no nordeste do país (Cardoso et al., 2015). Em março, amostras de soro obtidas de pacientes com diagnóstico presuntivo de doença viral aguda no Hospital Santa Helena em Camaraçari, na Bahia, foram analisados na Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, no Estado do Paraná. Onde foi relatado pela primeira vez uma infecção pelo ZIKV no Brasil associada a um surto contínuo de uma doença exantemática (Campos et al., 2015). Em 15 de maio, o primeiro relato de transmissão autóctone do ZIKV no Brasil foi confirmado em um paciente da Bahia (Zanluca et al., 2015). Em dezembro de 2015, 18 estados já haviam confirmado a transmissão autóctone do ZIKV, atingindo assim todas as cinco regiões brasileiras, o número estimado de casos suspeitos da infecção pelo ZIKV variou de 440.000 a 1.300.000 casos e ficou conhecido por ser o maior surto da história humana de ZIKV (Hennessey et al., 2016).

Embora tenha sido sugerido que o ZIKV foi introduzido no Brasil durante a competição da Copa do Mundo de futebol em 2014 (Salvador and Fujita, 2016), a não participação de equipes dos países do Pacífico Sul que tinham casos de ZIKV em circulação serviu como base para refutar essa hipótese. No entanto, nesse mesmo ano, o Brasil também sediou os campeonatos mundiais de canoagem da Primavera, no Rio

de Janeiro, com a participação de quatro membros de Países da Oceania em que circulava o ZIKV (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa). Estudos Filogenéticos sugerem que o ZIKV pode ter sido introduzido no Brasil durante esse evento esportivo (Musso, 2015).

A transmissão do ZIKV para outros países americanos foi relatada no final de 2015 e início de 2016 e atingiu quase todos os países da América Latina (Hennessey et al., 2016). O Mapa abaixo mostra as áreas infectadas pelo ZIKV na Figura 02. Embora tenham ocorrido casos importados da América do Sul para a Europa (Zammarchi et al., 2015; Bachiller-Luque et al., 2016) e América do Norte (Fonseca et al., 2014; McCarthy, 2016) a epidemia de ZIKV não se estabeleceu nesses continentes.



**Figura 2 - Dispersão do ZIKA Vírus.** O ZIKV foi descoberto na África em 1947, desde então casos esporádicos foram identificados em partes da África e no Sudeste Asiático, mas desde 2007 em diante, houve surtos em vários Países da Oceania, e assim o ZIKV se espalhou pelos países da América nos anos seguintes. Fonte: (Javed et al., 2018).

### 1.3. Transmissão

As arboviroses são provenientes de vírus que são mantidos na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados (Karabatsos, 1978). Para isso, é necessário que o artrópode hematófago tenha a capacidade de: (I) infectar hospedeiros vertebrados; (II) iniciar uma viremia em um hospedeiro vertebrado por tempo suficiente para permitir infecção do vetor invertebrado; e (III)

iniciar uma infecção produtiva persistente da glândula salivar do invertebrado, a fim de fornecer vírus para infecção de outros hospedeiros vertebrados (Casseb et al., 2013).

O principal modo de transmissão do ZIKV em ambientes urbanos e suburbanos é por meio da picada do mosquito vetor *Aedes aegypti*, embora o vírus tenha sido isolado pela primeira vez de um *Aedes africanus* (Dick, 1952), o ZIKV também foi isolado de várias outras espécies do gênero *Aedes*, como *Aedes albopictus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes hensilli*, e *Aedes polynesiensis* (Petersen et al., 2016), bem como em mosquitos do gênero *Culex sp.* (Guedes et al., 2017). O potencial de surgimento do ZIKV no Brasil foi grande, porque *A. aegypti* e *A. albopictus* têm uma ampla distribuição territorial (Marcondes and Ximenes, 2016), sendo o *A. aegypti* mais disperso nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (Coelho, 2012; Vega-Rua et al., 2014). Quanto às populações de *A. albopictus*, essas são maiores em áreas subtropicais, especialmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Carvalho et al., 2014).

Evidências de outras vias de transmissão do ZIKV surgiram em 2008, quando um cientista americano, seis dias após retornar do Senegal, desenvolveu sintomas compatíveis com ZIKV e hematoespermia. Quatro dias depois, logo após o seu retorno, sua esposa, que não viajou internacionalmente no ano anterior e com quem ele era sexualmente ativo, desenvolveu sintomas. Exames sorológicos de ambos detectaram anticorpos de fase aguda e convalescente para ZIKV, e não foram encontrados mosquitos vetores na região da residência do Cientista e da sua esposa (Foy et al., 2011). Em 2013, durante o surto da Polinésia Francesa, foi detectada uma alta carga viral para ZIKV no sêmen e na urina de um paciente que apresentou sintomas para ZIKV e, também, hematoespermia (Musso et al., 2015).

Em 2016, no início do surto nas Américas, experiências com viajantes que retornam de áreas de transmissão ativa para a América do Norte e Europa confirmaram contato sexual como um modo de transmissão. Em 18 de abril de 2017, 46 casos de Doença do ZIKV adquiridos sexualmente foram relatados aos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos. Enquanto a maioria dessas transmissões ocorreu de homens sintomáticos para mulheres (Russell et al., 2017), casos de transmissão de homem para homem (Deckard et al., 2016), transmissão mulher-homem (Davidson et al., 2016) e assintomático homem-mulher (Brooks et al., 2016) também foram documentados. Esses achados incentivaram pesquisas para determinar a frequência e a duração do ZIKV em fluidos genitais, especialmente no sêmen. No caso mais persistente já relatado, houve detecção do ZIKV no sêmen 370 dias após o início de sintomas (Barzon et al., 2018). Em outro estudo, a presença da infecção causada pelo vírus no sêmen foi descrita até 69 dias após início dos sintomas (García-Bujalance et al., 2017). A confirmação da transmissão sexual do ZIKV sugere um modo de transmissão inter-humana que pode ter contribuído para sua rápida disseminação (Gregory et al., 2017).

A transmissão pré-natal do ZIKV foi detectada em neonatos nascidos de mães com histórico de infecção durante o surto da Polinésia Francesa. O RNA do ZIKV foi detectado em amostras de soro das mães. Uma das lactentes permaneceu assintomática, enquanto a outra apresentou exantema maculopapular com trombocitopenia. Tanto as mães quanto os bebês se recuperaram sem intercorrências (Besnard et al., 2014). A transmissão materno-fetal foi confirmada durante o surto de ZIKV no Brasil em gestantes que deram à luz a neonatos com malformações graves (Pan American Health Organisation, 2015). O RNA do ZIKV foi detectado em amostras de líquido amniótico e sangue e tecido de recém-nascidos microcefálicos (Calvet et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016). A transmissão vertical do ZIKV de uma mãe grávida infectada para o feto em desenvolvimento, por meio da placenta, pode causar danos neurológicos a esse feto, como a Microcefalia (Mlakar et al., 2016). Embora o RNA do ZIKV tenha sido detectado no leite materno, não foram confirmados casos de transmissão da mãe para o bebê via amamentação, entretanto, essa via ainda não foi descartada (Mann et al., 2018).

A transfusão de sangue é outra rota potencial para a transmissão do ZIKV e foi suspeitada durante o surto da Polinésia Francesa em 2013-2014. O RNA do ZIKV foi detectado em cerca de 2,8% dos doadores de sangue que eram assintomáticos na região durante o surto de ZIKV (Musso et al., 2014). Em 2016, foram relatados casos confirmados de transmissão viral por transfusão de sangue no Brasil (Barjas-Castro et al., 2016). Outra possível fonte de transmissão do ZIKV, embora menos comum, é por meio de acidentes ou contaminações em laboratórios (Filipe et al., 1973), como o caso de um membro de uma equipe de um laboratório na Pensilvânia que se furou com uma agulha que continha ZIKV e desenvolveu a doença posteriormente (Gregory et al., 2017).

#### **1.4. Manifestações Clínicas**

Embora a maioria das pessoas infectadas pelo ZIKV sejam assintomáticas (Slavov et al., 2017), os sintomas podem aparecer entre 3 a 11 dias após a picada do mosquito (Foy et al., 2011). A infecção causada por ZIKV se assemelha a uma forma leve da dengue (Fernanda Estofolete et al., 2016), pois os sintomas geralmente começam com uma dor de cabeça leve seguida por machas vermelhas (pescoço, face, tronco e braços, palmas das mãos e plantas dos pés), febre aguda baixa (37,8 °C - 38,5 °C), mal-estar, artralgia, mialgia e conjuntivite. Alguns sintomas como tosse, vômito, dor de garganta e dor retro orbitária também já foram relatados juntamente com algumas outras manifestações que incluem diarreia, constipação, dor abdominal e tontura, que foram menos comuns durante a infecção por ZIKV (Duffy et al., 2009; Petersen et al., 2016). Ao contrário da Dengue, não foram notificados sinais hemorrágicos em doentes infectados com ZIKV. A maioria dos sintomas desapareceram espontaneamente após 3 a 7 dias (Petersen et al., 2016).



Enquanto a maioria dos casos de infecção por ZIKV em humanos são de evolução benigna, durante a epidemia na Polinésia Francesa e no Brasil, foram relatados casos de complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Oehler et al., 2014; Brasil et al., 2016b; Cao-Lormeau et al., 2016). Ressalte-se que durante o surto de ZIKV no Brasil, mostrou-se pela primeira vez uma possível ligação entre a infecção por ZIKV na gravidez, a microcefalia e o desenvolvimento de uma síndrome congênita em fetos (Brasil et al., 2016a; Mlakar et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016).

### **1.5. Tropismo celular do ZIKV**

A infecção do ZIKV em um hospedeiro vertebrado passa por um engajamento sequencial de diferentes tipos celulares. A pele é a primeira barreira imunológica encontrada pelo ZIKV quando inoculado pela picada de um mosquito infectado (Garcia et al., 2017). Trabalhos recentes mostraram que fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas residentes na pele (células de Langerhans) foram altamente permissivos ao ZIKV, portanto, são os primeiros sítios de replicação do ZIKV (Hamel et al., 2015). Entretanto, já se sabe que os responsáveis pela disseminação do ZIKV são os monócitos circulantes (Foo et al., 2017). A infecção de monócitos que são carregados pela corrente sanguínea e macrófagos que infiltram os nódulos linfáticos permite que o vírus alcance outros locais do corpo (Khaiboullina et al., 2017; Michlmayr et al., 2017; Österlund et al., 2019).

O tropismo do ZIKV foi caracterizado graças a estudos em humanos e em modelos animais (camundongos e primatas) que detectaram o ZIKV em alguns tecidos e células específicas como é possível ver na Figura 3 (Miner and Diamond, 2017).

Estudos com camundongos imunocomprometidos infectados com ZIKV que desenvolveram conjuntivite, panuveíte e infecção da córnea, íris, nervo óptico e células ganglionares e bipolares na retina, apresentaram RNA Viral em todos esses locais e nas lágrimas (Miner et al., 2016b). A replicação viral encontrada em tecidos ópticos foi corroborada com a descoberta de que o RNA do ZIKV e o vírus infeccioso podem ser recuperados de fluido conjuntival humano (Sun et al., 2016).

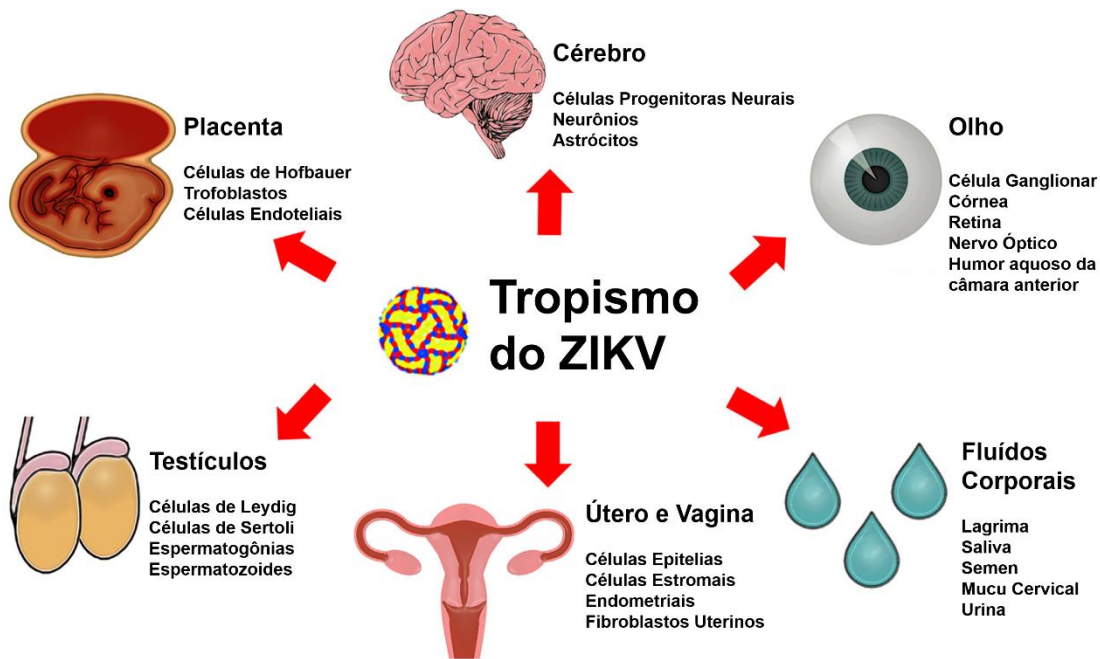
Vários estudos em camundongos demonstraram a infecção do trato reprodutor masculino pelo ZIKV (Almeida et al., 2020). A infecção de camundongos com uma cepa africana de ZIKV resultou na infecção de espermatogônias e células de Sertoli, na destruição da arquitetura testicular e na redução da contagem de espermatozoides móveis (Govero et al., 2016). Várias semanas após a infecção pelo ZIKV, os camundongos apresentaram níveis mais baixos dos hormônios sexuais testosterona e inibina B em comparação com os camundongos controles não infectados de mesma idade, e isso foi associado à fertilidade reduzida causada pelo ZIKV (Govero et al., 2016). Um estudo subsequente também demonstrou danos aos testículos de camundongos infectados com ZIKV e sugeriu que isso poderia resultar em infertilidade masculina (Ma et al., 2016). Embora a persistência crônica do RNA do

ZIKV em espermatozoides e sêmen tenha sido descrita em humanos até 6 meses (Barzon et al., 2016; Mansuy et al., 2016), lesões testiculares severas ainda não foram relatadas em humanos e, portanto, uma avaliação longitudinal em homens infectados deve ser realizada.

O tropismo do ZIKV pelo sistema reprodutor feminino foi demonstrado por diversos estudos, dentre eles, um estudo descobriu que o RNA do ZIKV é detectável no muco do colo uterino humano por pelo menos 11 dias após o início dos sintomas (Prisant et al., 2016). Um relato de caso subsequente descreveu a persistência do RNA do ZIKV em secreções vaginais humanas por mais de 11 semanas (Murray et al., 2017). Estudos *in vitro* demonstraram que os fibroblastos uterinos humanos são suscetíveis à infecção pelo ZIKV (Chen et al., 2016), o que sugere que a infecção uterina pode contribuir para o comprometimento do desenvolvimento fetal.

Na busca por descobrir os mecanismos de patogênese da microcefalia, estudos em camundongos fêmea grávidas inoculados com um isolado clínico de ZIKV da Polinésia Francesa demonstraram que o ZIKV infecta trofoblastos da placenta materna e fetal, células endoteliais da placenta e macrófagos placentários humanos primários chamados células de Hofbauer (Chen et al., 2016; Miner et al., 2016a; Quicke et al., 2016). Essas descobertas são consistentes com uma via de infecção transplacentária, ou seja, o ZIKV atravessa a placenta para infectar a feto (Tabata et al., 2016).

Um potencial mecanismo para a microcefalia é que o ZIKV infecta e induz apoptose em células progenitoras neurais (Dang et al., 2016; Onorati et al., 2016; Tang et al., 2016), embora o ZIKV também infecte neurônios maduros em menor grau (Tang et al., 2016) e astrócitos (Stefanik et al., 2018). Esta capacidade do ZIKV de infectar e danificar as células progenitoras neurais, pode atrapalhar o desenvolvimento cerebral dos fetos de mães infectadas com ZIKV. Essas descobertas demonstram um conjunto de células suscetíveis à infecção pelo ZIKV e, portanto, um robusto número de receptores celulares envolvidos no processo de entrada viral.



**Figura 3 - Tropismo celular e tecidual do ZIKV.** Estudos em modelos humanos e animais (camundongos e primatas) detectaram o ZIKV em células da Placenta, Útero, Vagina, Testículos, Cérebro, Olho e nos diversos fluidos corporais. Fonte: Adaptado de (Miner and Diamond, 2017).

### 1.6. Receptores celulares

A entrada do ZIKV nas células depende da presença de receptores de superfície celular específicos que facilitam sua permissividade. Vários receptores celulares já foram identificados como facilitadores da infecção por ZIKV, incluindo: DC-SIGN (CD209), receptores TIM-1 e TAM (TYRO-3 e AXL) (Hamel et al., 2015).

O DC-SIGN é um receptor imune inato presente na superfície de macrófagos e células dendríticas. Ele reconhece uma ampla gama de ligantes derivados de patógenos e medeiam a captação e a sinalização de antígenos (García-Vallejo et al., 2013). AXL e Tyro3 são parte da família de receptores tirosina quinase conhecidos como TAM (TYRO-3, AXL e MER). Esses receptores regulam uma série de atividades celulares incluindo adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular, bem como a liberação de citocinas que desempenham papéis essenciais na imunidade inata (Lemke and Rothlin, 2008). Já o receptor TIM-1 (Imunoglobulina de células T e domínio de mucina 1), também conhecido como HAVcr-1 (receptor celular do vírus da hepatite A 1), é expresso preferencialmente em células Th2 e foi identificado como uma molécula estimuladora para ativação de células T (Umetsu et al., 2005), além disso, o TIM-1 serve como receptor e promove a infecção de vários vírus envelopados como a Dengue e o Ebola (Jemielity et al., 2013).

Vários estudos em modelos experimentais de camundongos também mostraram que os receptores TAM, em particular AXL, são determinantes, embora não essenciais, para a infecção por ZIKV (Li et al., 2017; Wang et al., 2017d). O receptor AXL foi apontado como o receptor alvo principal para a entrada do ZIKV, por ser

altamente expresso na superfície de diversos tipos celulares que incluem células endoteliais humanas (hECs) (Li et al., 2016), células-tronco neurais (Nowakowski et al., 2016), micróglia (Meertens et al., 2017), astrócitos (Chen et al., 2018) e células precursoras de oligodendrócitos (Retallack et al., 2016). Outros tipos de células humanas permissivas e não neuronais do ZIKV, que são conhecidos por expressarem AXL, Tyro3 e/ou TIM-1 e provavelmente mediarão a entrada do ZIKV, incluem células primárias da placenta humana, citotrofoblastos, células endoteliais, fibroblastos e células de Hofbauer em vilosidades coriônicas e células epiteliais amnióticas e progenitores de trofoblastos em membranas amniocoriônicas (Tabata et al., 2016).

Embora a identificação e a importância desses receptores tenham sido demonstradas para o sucesso da infecção do ZIKV em diversos tipos celulares, pode haver alguns receptores ainda não identificados que estejam mediando a entrada do ZIKV e facilitando o processo de infecção e patogênese. Portanto, outras investigações ainda são necessárias para identificá-los e para que possam representar um potencial alvo terapêutico.

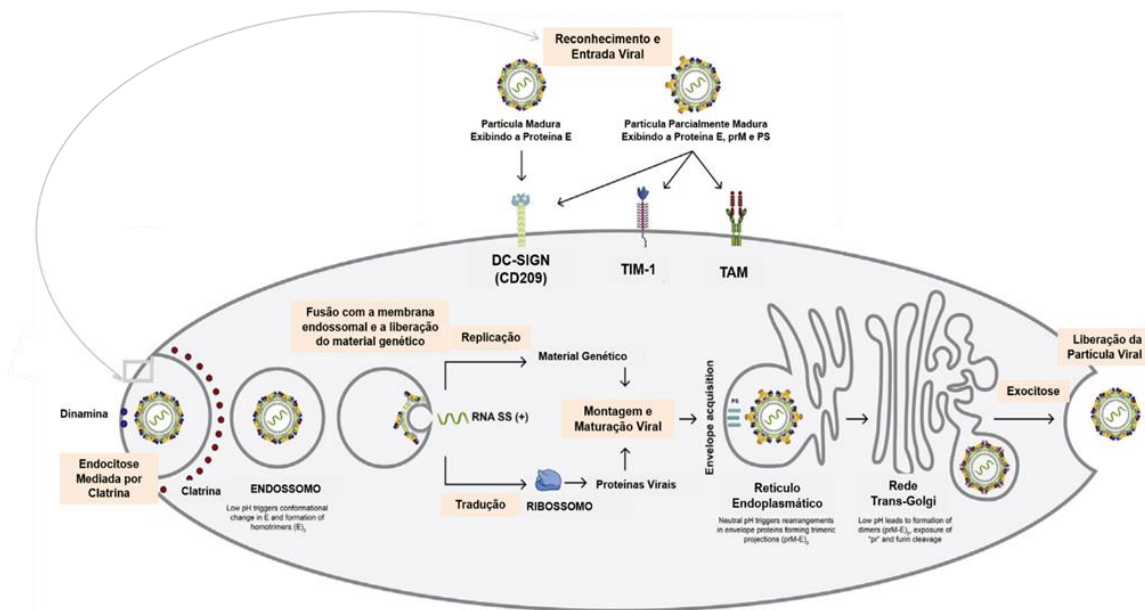
### **1.7. Ciclo celular**

O ciclo celular do ZIKV na Célula hospedeira (Figura 04) inicia-se com a entrada do ZIKV nas células-alvo, que pode ser mediada pela interação de N glicanos conjugados à proteína E com os receptores de superfície celular DC-SIGN (Hasan et al., 2017; Kim et al., 2017b) e, também, pode ser mediado por lipídios carregados negativamente, como a fosfatidilserina, presentes na membrana viral e os receptores TIM e TAM (Hamel et al., 2015). A função fisiológica dos receptores TIM e TAM é reconhecer lipídios carregados negativamente em células apoptóticas e desencadear endocitose por células fagocíticas (Mercer et al., 2010; Fairn et al., 2011). Esse processo foi previamente identificado em um grande número de vírus e é denominado “mimetismo apoptótico” (Amara and Mercer, 2015), no qual o vírus induz uma endocitose para entrar na célula hospedeira.

Após o reconhecimento do ZIKV pelos receptores, uma endocitose mediada por Clatrina é iniciada (Hackett and Cherry, 2018; Persaud et al., 2018). O complexo vírus-receptor inicialmente formado é transportado para um poço pré-existente revestido de clatrina (Smit et al., 2011). O poço revestido por clatrina evolui e a invaginação na membrana plasmática é fechada por excisão da membrana, mediada por dinamina, para formar uma vesícula revestida por clatrina. Essa vesícula é transportada para o interior do citoplasma e, em seguida, o revestimento de clatrina é liberado. A seguir, a vesícula endocítica que carrega o vírus é entregue aos endossomos iniciais, que amadurecem em endossomos tardios. O ambiente ácido do endossomo desencadeia a trimerização irreversível da proteína E do ZIKV, resultando na fusão da membrana viral com a membrana do endossomo (Smit et al., 2011; Harrison, 2015), fazendo com que o RNA viral seja liberado no citoplasma.

O RNA viral no citoplasma é reconhecido pelos ribossomos, e inicia-se a tradução na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER). As proteases virais e celulares catalisam a clivagem da poliproteína do ZIKV em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais já descritas (Kuno and Chang, 2007). Já a replicação do genoma viral, esta ocorre dentro de pacotes de vesículas (VPs) formados por invaginações da membrana do RER. Aberturas semelhantes a poros conectam o interior das vesículas com o citosol para permitir a troca de metabólitos e o tráfego do genoma do RNA viral recém-sintetizado (Welsch et al., 2009). Os vírions se agrupam por meio da brotação do nucleocapsídeo dentro das cisternas do RER próximo aos VPs (Neufeldt et al., 2018).

Após a montagem, os vírions imaturos transitam do RER para a rede trans-Golgi (TGN), e, durante este processo, passam por ação de proteases e maturação dependentes de pH (Hasan et al., 2018). Durante a maturação viral, o baixo pH da rede trans-Golgi induz uma reorganização das projeções triméricas das proteínas precursoras de Membrana e Envelope (prM-E)<sub>3</sub> em dímeros (prM-E)<sub>2</sub> (Yu et al., 2008). Este rearranjo estrutural expõe o local de clivagem da prM a ser digerido pela protease hospedeira: furina (Yu et al., 2008; Heinz and Stiasny, 2012). A porção “pr” clivada do prM permanece associada ao vírus até que este seja exocitado para fora da célula hospedeira, onde finalmente se dissocia, devido ao pH neutro do meio extracelular (Hasan et al., 2018).



**Figura 4 - Receptores e ciclo celular do ZIKV.** O ZIKV entra na célula hospedeira via reconhecimento e ligação com os receptores DC-SIGN, TIM-1 e TAM, a seguir induz uma endocitose mediada por clatrina, e no endossomo ocorre a fusão das membranas e liberação do RNA viral [RNA SS (+)], esse é traduzido pelos ribossomos e no reticulo endoplasmático ocorre a replicação do RNA viral e a montagem do vírion, entretanto, a maturação do vírion ocorre na Rede Trans-Golgi e, em seguida, a partícula viral madura é secretada por exocitose. Fonte: Adaptado de (Agrelli et al., 2019).

## 1.8. Resposta Imune Inata ao ZIKV

A resposta imune inata antiviral começa com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) virais, pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) da célula hospedeira. A ativação dos PRRs levará à ativação de cascatas de sinalização de proteínas que regulam a síntese de IFNs, que apresentam propriedades antivirais, anti-proliferativas e funções imuno moduladoras (Seth et al., 2006; Takeuchi and Akira, 2010).

Pelo menos quatro classes principais de PRRs contribuem para a detecção efetiva do ZIKV: (1) receptores do tipo Toll (TLR), que detectam o RNA viral dentro do endossomo; (2) receptores semelhantes ao gene I induzido por ácido retinóico (RIG-I) (RLRs), como o próprio RIG-I e a proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5), que reconhece RNA viral no citoplasma; (3) GMP-AMP sintase cíclica (cGAS), um sensor que detecta DNA citosólico; e (4) receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos ou receptores semelhantes a NOD (NLRs), em especial o NLRP3 e o AIM-2 (Suthar et al., 2013; Rodrigues de Sousa et al., 2020). A sinalização induzida por TLRs, RLRs e cGAS converge em uma cascata de sinalização comum que, em última etapa, dispara a transcrição de IFN e de outras citocinas, bem como Genes Estimulados por Interferon (ISGs) (Serman and Gack, 2019).

Os TLRs endossomais, em especial o TLR3 e o TLR7, são fundamentais para o reconhecimento inato de diversos Flavivírus (Guo et al., 2018). O TLR3 recruta a proteína adaptadora TRIF (Adaptador contendo o domínio TIR indutor de Interferon- $\beta$ ), já o TLR7 recruta a proteína adaptadora MyD88 (Proteína adaptadora de diferenciação mieloide 88). Ambas as proteínas adaptadoras, TRIF e MyD88, irão ativar os fatores de transcrição IRF3 (Fator Regulador de Interferon 3), IRF7 (Fator Regulador de Interferon 7) e NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) para desencadear a produção dos IFNs tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e IFNs tipo III ( $\lambda$ ), citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e ISGs (Lester and Li, 2014).

Em fibroblastos humanos foi demonstrado que a infecção por ZIKV induz um aumento na expressão de TLR3 e TLR7 (Hamel et al., 2015), já em modelo organoide cerebral, a infecção por ZIKV em células progenitoras neurais mostra a ativação de TLR3, que desencadeia apoptose e atenua a neurogênese (Dang et al., 2016). A estimulação de macrófagos derivados de monócitos com um agonista de TLR7/8 restringiu a replicação do ZIKV por meio da indução da expressão de vários ISGs (Vanwalscappel et al., 2018). Em resumo, esses estudos fornecem evidências do reconhecimento do ZIKV por TLR3 e TLR7, embora a detecção direta do ZIKV por esses PAMPs ainda não tenha sido totalmente demonstrada.

Os RLRs são considerados os principais sensores intracelulares para o reconhecimento de PAMPs de RNA de fita dupla viral no citoplasma (Kato et al., 2006). Entre os representantes, RIG-I e MDA5 são compostos por domínios de ativação e recrutamento de caspases (CARDs) seguidos por um domínio de helicase

de RNA (DExD/H Box) que tem atividade ATPase e um domínio repressor C-terminal (RD) (Yoneyama et al., 2005). Em condições de repouso, RIG-I reside no citoplasma em uma forma inativa que é auto inibida por seu domínio repressor. Após a infecção viral, RIG-I sofre uma mudança conformacional pela qual se dimeriza de uma forma dependente de ATP (Yoneyama et al., 2004). A forma multimérica ativada de RIG-I ou MDA5 então interage com a proteína adaptadora de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) (Seth et al., 2005), também conhecida como promotor estimulador de Interferon 1 (IPS-1), por meio de interações CARD-CARD (Kawai et al., 2005). O MAVS está localizado no folheto externo da membrana mitocondrial e em peroxissomos. Após o acoplamento de RIG-I ou MDA5 com MAVS, MAVS ativa as quinases relacionadas a IKK, que são responsáveis pela fosforilação de vários fatores de transcrição, como NFkB, IRF3 e IRF7 que levam à expressão de ISGs, IFN-I e citocinas pró-inflamatórias (Reikine et al., 2014).

A detecção de Flavivírus dentro da célula pelos RLRs, MDA5 e RIG-I, foi bem caracterizada no contexto de infecção por Vírus do Nilo Ocidental (WNV) e DENV (Fredericksen et al., 2008; Nasirudeen et al., 2011). O papel desses RLRs na infecção do ZIKV também foi demonstrado por vários estudos. Fibroblastos humanos infectados com ZIKV apresentaram regulação transcricional positiva de RIG-I e MDA5, embora o silenciamento desses sensores não tenha afetado significativamente a replicação do ZIKV nestas células (Hamel et al., 2015). Da mesma forma, as células dendríticas humanas regularam positivamente o transcrito e a expressão proteica de RIG-I e MDA5 após infecção por ZIKV (Bowen et al., 2017). Além disso, descobriu-se que a replicação do ZIKV é aumentada em células trofoblásticas humanas nocautes para RIG-I, MDA5 e MAVS. Conseqüentemente, a expressão de IFN induzido por ZIKV foi reduzida em células trofoblásticas nocautes para RIG-I e MDA5, e completamente abolida em células nocautes para MAVS (Ma et al., 2018). Experimentos em células epiteliais de pulmão humano (A549) mostraram que o RIG-I é o principal RLR para a detecção do ZIKV (Esser-Nobis et al., 2019). Estes estudos indicaram que o RNA do ZIKV é detectado por RIG-I e MDA5, em que a contribuição relativa dos dois sensores para indução de IFNs e a diminuição da replicação viral difere de acordo com o tipo celular (Serman and Gack, 2019).

O DNA citosólico é um potente ativador de uma resposta via IFN-I (Stetson and Medzhitov, 2006). Após infecções virais, quantidades aumentadas de DNA intracelular são detectadas em uma via que envolve GMP-AMP sintase cíclica (cGAS), um membro da família de enzimas nucleotidiltransferase (NTase), que funciona sinergicamente com a proteína estimuladora de genes de interferon (STING) (Sun et al., 2013; Wu et al., 2013). O cGAS normalmente reside como uma proteína inativa na célula, após a ligação ao DNA, o cGAS sofre uma mudança conformacional para um estado ativo e produz o segundo mensageiro GMP-AMP cíclico (cGAMP) de ATP e GTP, que é subsequentemente detectada pelo STING (Diner et al., 2013), que então se transloca para o Golgi e ativa a quinase 1 de ligação, a TANK (TBK1). TBK1 então fosforila a si mesmo, a STING e, subsequentemente, o IRF3. O IRF3

dimeriza-se, entra no núcleo e desencadeia a produção de IFN-I e a expressão de ISGs que, juntos, orquestram os mecanismos de defesa antiviral (Hopfner and Hornung, 2020).

O eixo de sinalização cGAS-STING já é conhecido por detectar e restringir infecções por Flavivírus (Gack and Diamond, 2016). Mecanicamente, foi demonstrado que o DNA mitocondrial (mtDNA) que vazou para o citosol após dano induzido por DENV das membranas mitocondriais leva à ativação de cGAS-STING e ao aumento da expressão de IFN-I (Aguirre et al., 2017; Sun et al., 2017a). Com relação à infecção por ZIKV, um estudo recente demonstrou que a replicação do ZIKV é aumentada e a indução de IFN-I reduzida em THP1 (células monocíticas humanas) cGAS<sup>-/-</sup> e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (Zheng et al., 2018). Além disso, outro estudo demonstrou que a replicação do ZIKV é aumentada em fibroblastos humanos STING<sup>-/-</sup> e que o ZIKV antagoniza ativamente o STING dentro da via do cGAS (Ding et al., 2018).

A resposta imune inata via IFN-I serve como a primeira linha de defesa para combater infecções virais (Schneider et al., 2014). Tanto o IFN- $\alpha$  e quanto o IFN- $\beta$  usam o mesmo receptor, o IFN- $\alpha/\beta$  (IFNAR), que é expresso em uma grande variedade de tipos celulares (Theofilopoulos et al., 2005). Este receptor está associado à Janus quinase 1 (JAK1) e à Tirosina quinase 2 (TYK2). A ligação de IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$  a IFNAR ativa JAK1 e TYK2, que consequentemente fosforilam o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) e STAT2 (Malmgaard, 2004), essa ligação pode desencadear uma regulação positiva de forma parácrina e/ou autócrina (Suthar et al., 2013). Uma vez fosforilados, esses fatores se associam com IRF9 para formar o complexo de fator 3 do gene estimulado por IFN (ISGF3). No núcleo, este complexo se liga a sequências de DNA específicas contendo elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE) que promovem a transcrição de centenas de genes estimulados por IFN (ISGs), incluindo IRF1, IRF7, IRF8 e IRF9, cuja função é inibir a replicação viral e induzir uma resposta antiviral na área da célula infectada (Taniguchi and Takaoka, 2002; Malmgaard, 2004; Ivashkiv and Donlin, 2014).

Diversos estudos mostram uma regulação ambígua do ZIKV na via de IFN. Alguns estudos relataram a capacidade dos macrófagos placentários e trofoblastos primários humanos de limitar a infecção pelo ZIKV, induzindo a produção de IFN tipo I e III (especialmente IFN- $\lambda$ 1), respectivamente (Bayer et al., 2016; Quicke et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que a exposição de fibroblastos primários humanos ao ZIKV desencadeia a resposta do IFN- $\beta$ , acompanhada pela ativação das vias de sinalização do IFN tipo I e pela expressão de diversos genes antivirais (Hamel et al., 2015). Já um estudo com células A549 infectadas com ZIKV, demonstrou uma susceptibilidade muito eficiente desta célula, visto que houve uma rápida proliferação do ZIKV nesse modelo. Além da secreção de IFN- $\beta$  seguida pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, e a proteína 1 quimioatratante de monócitos (MCP-1), e o aumento da atividade transcricional de ISGs. Ao atingir o nível máximo de replicação nessa célula, o ZIKV desencadeou morte por apoptose



por meio da ativação das caspases-3 e 9, enquanto que nos primeiros tempos de infecção, a rápida liberação de IFN- $\beta$  exerceu um efeito antiviral contra o ZIKV o que atrasou a apoptose nas células infectadas, favorecendo a replicação (Frumence et al., 2016).

Diversos grupos de pesquisa demonstraram que o ZIKV desenvolveu várias estratégias para combater a resposta antiviral de IFN (Grant et al., 2016; Kumar et al., 2016; Wu et al., 2017; Xia et al., 2018). As estratégias antagonísticas de IFN podem ser divididas principalmente em dois tipos (Fernandez-Garcia et al., 2009). A primeira estratégia empregada pelo ZIKV é o antagonismo direto da ativação de PRRs; e a segunda estratégia é reduzir e retardar a ativação e produção de IFN, inibindo as moléculas de sinalização da via do IFN (Figura 05) (Serman and Gack, 2019). Essas estratégias são mediadas pelas proteínas não estruturais do ZIKV que atenuam a resposta antiviral inata em diferentes níveis da via de sinalização de IFN e ajudam cooperativamente o ZIKV a inibir a resposta imune do hospedeiro (Bowen et al., 2018).

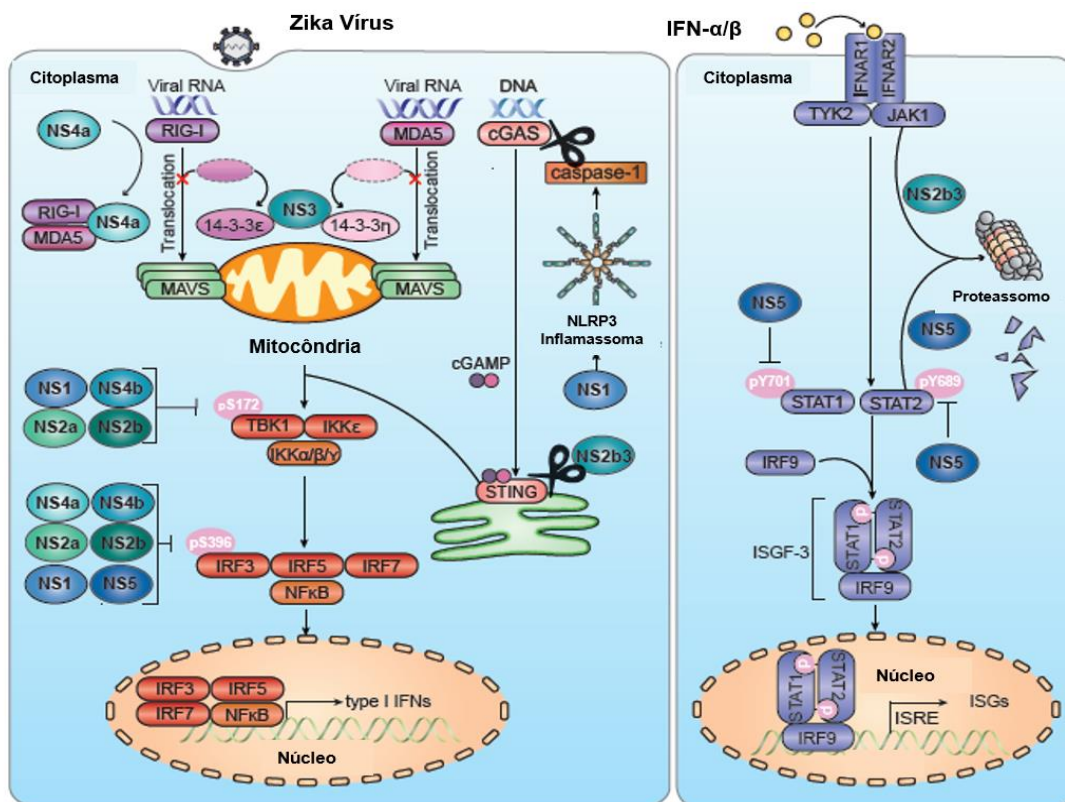
O ZIKV é capaz de neutralizar a imunidade inata mediada por RIG-I e MDA5 ao interromper as interações de ambos os RLRs com suas respectivas proteínas adaptadoras. Especificamente, a proteína 14-3-3 $\epsilon$  promove a translocação de RIG-I do citoplasma para a mitocôndria, enquanto que a proteína 14-3-3 $\eta$  facilita a translocação do MDA5 do citoplasma para a mitocôndria, promovendo assim a indução de IFN antiviral (Liu et al., 2012; Lin et al., 2019a). A NS3 do ZIKV antagoniza a sinalização mediada por RIG-I e MDA5 via mimetismo molecular, se liga e sequestra as proteínas 14-3-3 $\epsilon$  e 14-3-3 $\eta$ , o que impede a translocação desses RLRs para a mitocôndria e, conseqüentemente, a ativação da MAVS e a transcrição de fatores da via do IFN-I (Riedl et al., 2019). Outro exemplo é a NS4A do ZIKV, que se liga especificamente ao domínio CARD de MAVS e, portanto, bloqueia a ligação do RIG-I e MDA5 e, por conseguinte, a ativação da via (Ma et al., 2018).

Além do antagonismo viral de PRRs e de suas proteínas adaptadoras, as proteínas não estruturais do ZIKV inibem a sinalização imune inata no nível de TBK1 e IRF3. A NS1, NS2A, NS2B e NS4B inibem a fosforilação da TBK. A NS4A inibe a fosforilação do IRF3, e a NS5 interage com a TBK1 inibindo sua atividade e conseqüentemente a não fosforilação do IRF3 (Wu et al., 2017; Xia et al., 2018; Lin et al., 2019c). Embora, várias proteínas NS do ZIKV tenham sido relatadas como antagonistas da produção de IFN, muitas dessas estratégias de antagonismo ainda precisam ser confirmadas durante a infecção pelo ZIKV ativo, e sua relevância para a replicação eficaz do vírus e evasão imune devem ser testadas *in vivo* (Serman and Gack, 2019).

Na tentativa de reduzir e retardar a ativação e a produção de IFN já foi demonstrado que a proteína NS5 do ZIKV é capaz de se ligar e degradar STAT2 para inibir a sinalização IFN tipo I em vários tipos celulares (Grant et al., 2016; Kumar et al., 2016). No entanto, este efeito pode ser dependente do tipo celular, pois a infecção

de células dendríticas derivadas de monócitos primários humanos resultaram na indução da expressão de STAT1 e STAT2 (Bowen et al., 2017). Além da proteína NS5, um estudo recente sugere que a protease NS2B/NS3 é capaz de facilitar a degradação da JAK1 quinase *in vitro*, resultando em uma redução na fosforilação de STAT1, inibindo assim a sinalização JAK-STAT e coincidentemente inibindo a expressão de ISGs (Wu et al., 2017).

A proteína ZIKV NS5 é capaz de ativar de maneira seletiva o IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ). Enquanto nos IFNs tipo I e III a NS5 do ZIKV suprime sua atividade por meio da degradação da STAT2, ocorre simultaneamente a formação de dímeros de STAT1, que ativam genes controlados por IFN tipo II, como o gene que codifica a citocina pró-inflamatória CXCL10 (Chaudhary et al., 2017). Essa ativação seletiva da sinalização de IFN- $\gamma$  pelo ZIKV também pode ter um impacto em outras funções imunológicas reguladas por IFN- $\gamma$ , como a ativação de macrófagos e a resposta Th1 (Chaudhary et al., 2017).



**Figura 5 - Inibição mediada pelo ZIKV das vias de sinalização que levam à indução de interferon tipo I (IFN-I) e genes estimulados por IFN (ISGs).** Durante a infecção pelo vírus Zika (ZIKV), as proteínas virais não estruturais (NS) estão envolvidas no antagonismo da transdução de sinal mediada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que levam à indução de interferon tipo I (IFN-I) (painel esquerdo), bem como da expressão mediada por IFN- $\alpha/\beta$  e de genes estimulados por IFN (ISGs) (painel direito). A NS3 se liga às proteínas 14-3-3 $\epsilon$  e 14-3-3 $\eta$  e impede a translocação do RIG-I e do MDA5 do citoplasma para a mitocôndria, para ativar a MAVS. A NS4A bloqueia a ligação do RIG-I e do MDA5 a MAVS. A NS1, NS2A, NS2B e NS4B inibem a fosforilação da TBK1. A NS1, NS2A, NS2B, NS4A, NS4B e NS5 inibem a fosforilação de IRF3. Todos esses mecanismos impedem a transcrição de ISGs e IFN-I. No lado Direito, a NS5 inibe a fosforilação de STAT1 e STAT2 e se liga e degrada a STAT2. Já a NS2B/NS3 degrada a JAK1 e impede a fosforilação das STATs. Fonte: Adaptado de (Serman and Gack, 2019).

Como uma das principais células envolvidas na imunidade inata, os macrófagos orquestram uma série de mecanismos reguladores para manter o equilíbrio homeostático e o controle da resposta do sistema imunológico, como a polarização em fenótipos M1 e M2 (Gordon, 2003; Murray and Wynn, 2011; Murray, 2017). As interações do ZIKV com macrófagos mostraram que o vírus tem uma predileção por infectar essas células, em especial na placenta (Quicke et al., 2016). Na placenta, as células de Hofbauer infectadas com ZIKV expressaram grandes quantidades de CD68, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e CCL5, indicando que a resposta pró-inflamatória contribui significativamente para o dano tecidual (Rabelo et al., 2018).

Em uma via alternativa, o fenótipo de macrófagos M2 está envolvido na contenção do processo inflamatório e na promoção do reparo tecidual. No entanto, essa polarização facilita o processo de replicação viral devido ao efeito anti-inflamatório induzido pela citocina IL-10 (Hirsch et al., 2018). Pesquisas em humanos demonstram uma ampla distribuição de células de Hofbauer com fenótipo M2 no estroma, marcados por CD163, um receptor scavenger que parece facilitar a entrada do ZIKV na célula (Schwartz, 2017). Experimentos *in vitro* mostraram que certas cepas asiáticas de ZIKV conseguem modular diretamente o fenótipo M2 durante a gravidez. Um estudo com monócitos sanguíneos CD14<sup>+</sup> revelou que a exacerbação da imunossupressão ocorre devido à predominância de IL-10, CD163, proteína 1 do tipo quitinase-3 (CHI3L1), mediadas por uma resposta a IL-12 p40 (Foo et al., 2017).

No sistema nervoso central (SNC), as micróglia são consideradas macrófagos residentes de origem mesodérmica/mesenquimal, que migram para todas as regiões do SNC (Ginhoux et al., 2013). Como em outros órgãos e sistemas, a via de diferenciação da micróglia pode produzir ambos os fenótipos M1 e/ou M2 no SNC (Tang and Le, 2016). No SNC, o fenótipo M1 aumenta a neuroinflamação e, nos casos de microcefalia induzida por ZIKV, a resposta pró-inflamatória é desencadeada por IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , MCP-1 e iNOS. Em contraste, o fenótipo M2 resulta no desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória e imunossupressora que protege o parênquima neural dos efeitos deletérios causados pela neuroinflamação. A resposta anti-inflamatória nesta situação é mediada por citocinas, como IL-4, IL-10, IL-33, IL-37, TGF- $\beta$  e arginase 1. Curiosamente, no SNC de casos humanos de microcefalia induzida por ZIKV, ambas as micróglia M1 e M2 atuam em conjunto para regular o mecanismo de lesão celular. Nesse contexto, a apoptose induzida pelo fenótipo M1 ou M2 se correlaciona com a expressão da caspase3. Em áreas necróticas, as citocinas envolvidas na modulação da necroptose são altamente expressas no córtex cerebral, como é o caso de IL-33 e TNF- $\alpha$  (Azevedo et al., 2018).

As células dendríticas, juntamente com os macrófagos, pertencem a um grupo de células apresentadoras de antígenos (APCs), atualmente descritos como sentinelas, que orquestram a iniciação das respostas imunes inatas e adaptativas (Worbs et al., 2017). Na pele, as células dendríticas desempenham papel central no processo

infeccioso desencadeado pelo ZIKV, pois além delas reconhecerem, se infectarem, e desencadearem a resposta imune inata como descrito acima, elas também migram para outros tecidos e apresentam antígenos virais para os linfócitos durante a infecção viral (Hamel et al., 2015; Bowen et al., 2017; Sun et al., 2017b; Azevedo et al., 2018).

As células exterminadoras naturais (NK) são linfócitos inatos especializados na defesa antiviral e também na resposta contra células tumorais, infecções bacterianas e fúngicas (Vivier et al., 2008). As células NK expressam uma variedade de receptores de ativação e inibição que medeiam a morte de seus alvos. Os receptores inibitórios das células NK reconhecem principalmente proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I (MHC-I) (Horowitz et al., 2012). Em células epiteliais retiniais (ARPE-19) infectadas com ZIKV, a alta expressão de proteínas MHC-I foi mediada pelo feedback positivo de IFN- $\beta$  e a inibição da atividade das células NK. Além disso, a infecção pelo ZIKV é dificilmente detectada pelas células NK, uma vez que não foi observado aumento na expressão de ligantes ativadores de células NK após a infecção pelo ZIKV (Glasner et al., 2017a).

### **1.9. Inflamassoma**

A citocina pró-inflamatória Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é um componente central nas respostas inflamatórias, pois ela induz a expressão de genes associados à imunidade e facilita o recrutamento de linfócitos para a local da infecção (Dinarello, 2009). Além disso, desempenha um papel importante na febre, septicemia, choque e outras doenças inflamatórias (Shrivastava et al., 2016). A geração da IL-1 $\beta$  ativa e madura requer a clivagem do seu precursor pró-IL-1 $\beta$  pelos inflamassomas (Lamkanfi and Dixit, 2012). Os inflamassomas são um grande complexo multiproteico que detecta estímulos de infecção ou perigo na célula e controla a maturação e secreção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (Lamkanfi and Dixit, 2012).

Os inflamassomas são compostos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) intracelulares conhecidos por receptores do tipo Node (NLRs), e possuem a divisão em três subfamílias: NOD, NLRP e IPAF (NLRC). Esses são constituídos por três regiões funcionais, uma região NOD de regulação localizada na posição central, uma região N-terminal efetora envolvida na sinalização, nesse domínio pode conter um domínio pirina (PYD), um domínio para recrutamento de caspase (CARD), ou um domínio inibidor de apoptose (BIR), e a região C-terminal que é composta por repetições ricas em leucina (LRRs) (Schroder and Tschopp, 2010). A montagem desse complexo ocorre de forma que o NLR recruta uma proteína adaptadora associada a apoptose (ASC), que interage com a Caspase-1 ou Caspase-11 levando à sua ativação, para que essa possa promover a maturação da IL-1 $\beta$  e IL-18 (Bauernfeind et al., 2011). Vários NLRs capazes de formar o complexo do inflamassoma já foram descritos, dentre eles: NLRP1, NLRP3 (NALP3), NLRP6, NLRC4 (IPAF) e AIM2 (Strowig et al., 2012). Dentre todos os inflamassomas até hoje descritos, o mais estudado e

caracterizado é o NLRP3, que desempenha um papel importante nas respostas inflamatórias e antivirais. (Lamkanfi and Dixit, 2014; Zhao and Zhao, 2020).

A ativação do inflamassoma NLRP3 requer sinais em níveis transcricional e pós-traducional. O primeiro sinal leva à síntese de pro-IL-1 $\beta$  e outros componentes do inflamassoma, como NLRP3, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a padrões moleculares associados a perigo (DAMPs), por receptores do tipo Toll e receptores de IL-1 que induzem a ativação da via do fator nuclear  $\kappa$ B. O segundo sinal é traduzido também por associação de PAMPs e DAMPs para ativar a montagem do Inflamassoma NLRP3, ativação da caspase 1 e secreção de IL-1 $\beta$  (Jo et al., 2015). Vários mecanismos moleculares têm sido indicados para essa ativação, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tschopp and Schroder, 2010), o efluxo de potássio e ATP (Pétrilli et al., 2007) e o dano lisossomal devido à liberação da protease catépsina B para o citoplasma (Cassel et al., 2009).

Além disso, a ativação dos inflamassomas e das caspases para a secreção de citocinas inflamatórias contribuem para o aumento da inflamação e o processo de morte celular conhecido como piroptose (Cookson and Brennan, 2001). A piroptose foi identificada como uma morte celular programada altamente associada à inflamação, caracterizada pela formação de poros na membrana plasmática, inchaço celular e ruptura da membrana plasmática e consequentes liberações de seus conteúdos citoplasmáticos, incluindo citocinas inflamatórias no ambiente extracelular (Bergsbaken et al., 2009). As Caspases-1-4/5 e 11 quando ativadas clivam a proteína formadora de poros, gasdermina D (GSDMD) (Miao et al., 2011; Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015), o domínio GSDMD N-terminal clivado (GSDMDNterm) liga-se à fosfatidilinositol e à fosfatidilserina da membrana lipídica onde oligomeriza-se em fenda, arco e estruturas em forma de anel formando poros que, por sua vez, levam ao inchaço celular, ao extravasamento do material citoplasmático e à morte celular (Liu et al., 2016; Mulvihill et al., 2018).

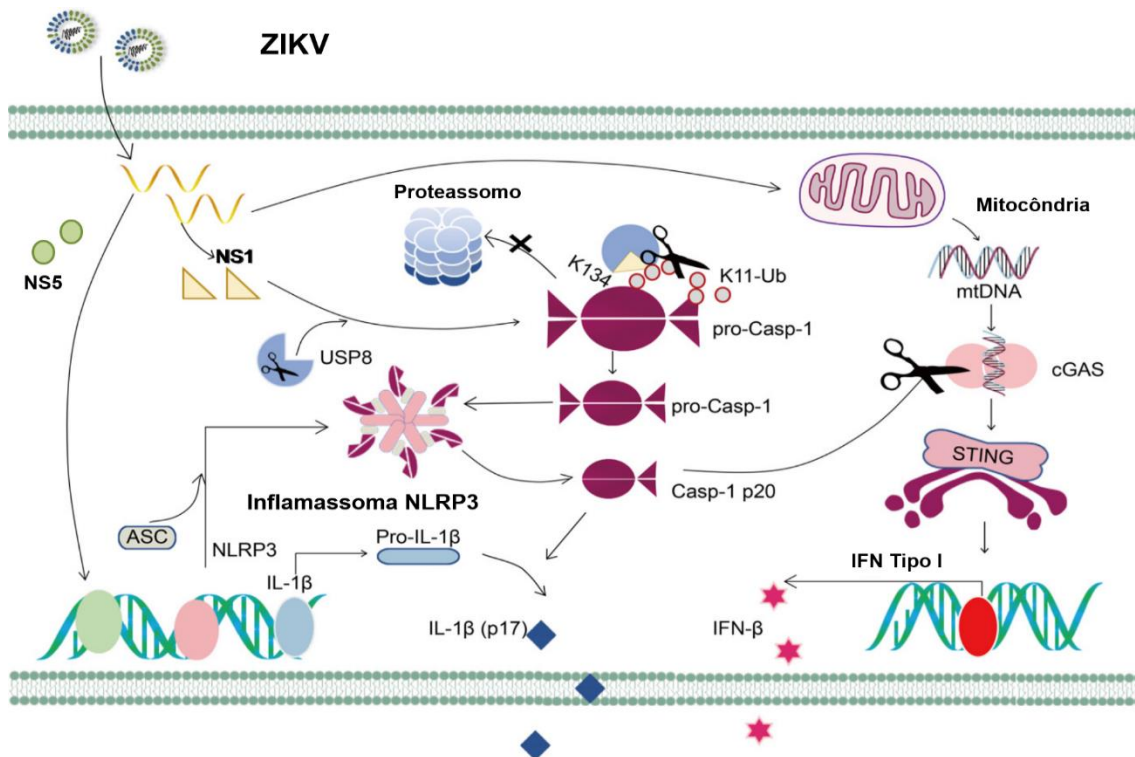
Os Inflamassomas estão diretamente envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra o ZIKV, que foi descoberto principalmente por estudos que investigaram o primeiro contato do vírus com a pele, em que o ZIKV induz a ativação do NLRP3 e AIM2 em fibroblastos humanos (Hamel et al., 2015). Estudos *in vitro* usando a linhagem de glioblastoma humano (U-87MG) demonstraram que o ZIKV pode mediar o desenvolvimento da resposta inflamatória pela ativação do NLRP3 e da Caspase1 e, por conseguinte, a clivagem da IL-1 $\beta$  (Tricarico et al., 2017).

O ZIKV estimula a secreção de IL-1 $\beta$  em pacientes humanos, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas, em macrófagos murinos, em camundongos e em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) (Wang et al., 2018). O reconhecimento da NS5 viral pelo receptor NLRP3 induz a ativação de NF -  $\kappa$ B, Caspase-1 e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à montagem do complexo do inflamassoma e induzindo ao aumento da secreção de

IL-1 $\beta$ ; esse mecanismo potencializa a neuroinflamação em camundongos imunocomprometidos (He et al., 2018; Wang et al., 2018).

Em casos fatais de Microcefalia induzida por ZIKV, análises *in situ* de tecidos cerebrais mostraram expressões mais elevadas dos receptores NLRP1, NLRP3 e AIM2, das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33, e das enzimas caspase-1, iNOS e arginase-1 (de Sousa et al., 2018). Um estudo recente mostrou que a infecção por ZIKV em camundongos neonatos imunocompetentes causa inflamação cerebral severa, com dano neuro-tecidual e atrofia cerebral. Além disso, foi demonstrado que o ZIKV causa piroptose em células neurais, incluindo células progenitoras neurais (NPCs), astrócitos e micróglia, mediada pela ativação da caspase-1 e GSDMD tanto *in vitro* quanto *in vivo* (He et al., 2020). Esses estudos sugerem que a ativação do inflamassoma pode agravar a resposta neuroinflamatória e consequentemente aumentar o dano ao SNC em neonatos com infecção por ZIKV, o que corrobora experimentalmente o desenvolvimento e a progressão da microcefalia induzida pelo ZIKV (de Sousa et al., 2018; He et al., 2020).

Na busca por entender a razão pela qual o ZIKV induz a ativação do inflamassoma nas células hospedeiras, Zheng e colaboradores demonstraram um novo mecanismo em que o ZIKV provoca estrategicamente a ativação do inflamassoma e a inflamação para evitar a resposta antiviral via IFN-I (Figura 06). A NS1 do ZIKV recruta a peptidase específica da ubiquitina 8 (USP8) para clivar as cadeias de poli-ubiquitinas ligadas a resíduos de lisina K11 da Caspase-1 em lisina K134, por meio deste mecanismo, envolvendo a inibição do complexo ubiquitina-proteossoma, a NS1 é capaz de estabilizar a Caspase-1 aumentando, assim, a ativação do Inflamassoma. A Caspase-1 ativa promove, por sua vez, a clivagem dos receptores GMP-AMP cíclico sintase (cGAS), que reconhece DNA citoplasmático e mitocondrial, e age de forma sinérgica com a proteína estimuladora de genes de interferon (STING) (Burdette et al., 2011). Com isso, a sinalização de IFN tipo I, durante a infecção pelo ZIKV, é atenuada, evitando a resposta antiviral do hospedeiro por essa via (Zheng et al., 2018).



**Figura 6 - Mecanismo de ativação do inflamassoma NLRP3 e inibição da sinalização de IFN-I mediada pelo ZIKV.** A proteína NS5 do ZIKV leva à ativação e à montagem do inflamassoma NLRP3 e à clivagem da Pró-IL-1β em IL-1β (p17) ativa. Já a proteína NS1 do ZIKV aumenta a ativação do inflamassoma, recrutando USP8 para clivar cadeias de poli-ubiquitina ligada a lisina K11 da Caspase-1 em lisina K134. A estabilização da Caspase-1 mediada por NS1 do ZIKV promove ainda a clivagem de cGAS, inibindo assim a sinalização de IFN tipo I via STING, impedindo a imunidade antiviral inata para beneficiar sua infecção e replicação. Fonte: Adaptado de (Zheng et al., 2018).

### 1.10. Resposta imune adaptativa ao ZIKV

A imunidade adaptativa, também chamada imunidade específica, é mediada por células conhecidas como linfócitos. Os linfócitos B medeiam a imunidade humoral, em que por meio da secreção de anticorpos reconhecem antígenos microbianos e eliminam os patógenos. Já os linfócitos T medeiam a imunidade celular, em que podem reconhecer antígenos e aumentar a capacidade microbicida das células apresentadoras de Antígenos (APCs). Os linfócitos T se dividem em linfócitos T CD4 (Auxiliares) que recrutam outros leucócitos por meio da secreção de citocinas e quimiocinas para destruir os microorganismos. E os linfócitos T CD8 (Citotóxicos) que destroem diretamente as células infectadas (Murphy, 2014; Abbas et al., 2015).

Uma variedade de modelos de camundongos foi usada para investigar a resposta imune celular à infecção pelo ZIKV. Inicialmente, a maioria dos modelos usava camundongos imunocomprometidos, que normalmente envolvem a deleção genética do receptor de IFN-I (IFNAR<sup>-/-</sup> e/ou A129), ou de ambos os receptores IFN-I e IFN-II, (AG129) ou tratamento com um anticorpo bloqueador anti-IFNAR antes da infecção, no

qual todos os modelos acima são altamente suscetíveis à infecção por ZIKV, com viremia e mortalidade dependente da idade (Lazear et al., 2016; Rossi et al., 2016).

Um estudo usando o modelo  $\text{LysMCre}^+\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ , que não possui o IFNAR em um subconjunto de células mieloides, mas expressa níveis normais de IFNAR em células T, células B e a maioria das células dendríticas, mostrou que a infecção pelo ZIKV causou um aumento na frequência de células T CD8 ativadas no baço, que se mostraram positivas para granzima B. Além disso, quando as células T CD8 foram depletadas nesse modelo, os camundongos  $\text{LysMCre}^+\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$  tiveram cargas virais mais altas no soro, no SNC e em outros tecidos. Isso foi revertido quando os mesmos camundongos depletados de células T CD8 receberam uma transferência de células T CD8 de memória. Porém, quando foram usados camundongos  $\text{CD8}^{-/-}$ , houve uma maior mortalidade causada pela infecção por ZIKV (Elong Ngono et al., 2017). Portanto, esses resultados demonstraram que as células T CD8 + possuem um papel fundamental na proteção contra a infecção pelo ZIKV.

Outro estudo em camundongos  $\text{LysMCre}^+\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$  descreveu uma resposta de células T CD4 Th1, bem como uma resposta de células T foliculares auxiliares (Tfh) de 7 dias após a infecção (dpi) em diante. Em adição, as células T CD4 foram necessárias para gerar uma resposta de anticorpos imunoglobulina G (IgG), mas sua depleção não teve impacto na resposta das células T CD8 e nem impactou a carga viral (Elong Ngono et al., 2019). Assim, as células T CD4 + podem ser mediadores e reguladores importantes na proteção contra a infecção por ZIKV.

Embora camundongos  $\text{IFNAR}^{-/-}$  sejam conhecidos por serem suscetíveis à infecção por ZIKV, a depleção de células T CD4 de camundongos com 10-12 semanas de idade  $\text{IFNAR}^{-/-}$  causou cargas virais mais altas, paralisia mais grave e sobrevivência reduzida (Hassert et al., 2018), e causou infecção letal em camundongos  $\text{IFNAR}^{-/-}$  de 3-4 semanas de idade (Lucas et al., 2018). Entretanto, quando esses camundongos receberam a transferência de células T CD4 de memória de camundongos imunes ao ZIKV, houve uma proteção contra a infecção e inibição da letalidade (Hassert et al., 2018; Lucas et al., 2018). Além disso, o efeito protetor da transferência das células T CD4 é dependente da sinalização de  $\text{IFN}\gamma$ , das células T CD8 e dos linfócitos B nos camundongos receptores, o que sugere que as células T CD4 são importantes para a promoção das respostas de células B e anticorpos contra o ZIKV (Lucas et al., 2018).

Embora tenhamos visto que estudos com modelos de camundongos deficientes em IFN-I e IFN-II, as células T CD4 e T CD8 desempenham um papel importante na resposta imune ao ZIKV, o IFN-II desempenha um papel crucial na promoção da ativação das células T CD4 e T CD8 (Tau et al., 2000, 2001). Portanto, modelos com camundongos imunocompetentes representam uma ferramenta muito útil para caracterizar e compreender mais fielmente as respostas das células T CD4 e T CD8 à infecção pelo ZIKV.

Em camundongos imunocompetentes, o ZIKV estabelece uma infecção autolimitada e assintomática (Pardy et al., 2017). No entanto, a infecção induz uma resposta robusta



das células T CD4 de perfil Th1, que apresenta a expressão do fator de transcrição T-bet e a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (Winkler et al., 2017; Hassert et al., 2018). Ao mesmo tempo, as células T CD8 regulam positivamente a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzem a granzima B e apresentam um fenótipo altamente ativado após infecção por ZIKV (Huang et al., 2017; Pardy et al., 2017). Além disso, esses modelos foram usados para a identificação e produção de epítomos de células T CD8 e T CD4 do ZIKV (Huang et al., 2017; Pardy et al., 2017; Hassert et al., 2018).

Dada a capacidade das células T CD8 de matar diretamente as células infectadas e a capacidade das células T CD4 e T CD8 de produzirem citocinas efetoras e moléculas citolíticas, é relevante observar se a resposta das células T induzida pelo ZIKV pode contribuir para a sua patogênese. Nesse contexto, os primeiros estudos com infecções de ZIKV em camundongos C57/BL06 WT neonatos (um dia de idade) mostraram que as lesões coriorretinianas e a degeneração neuronal estão correlacionadas com um infiltrado de células T CD8 nesses tecidos, sugerindo um papel potencial das células T CD8 na mediação do dano tecidual (Manangeeswaran et al., 2016, 2018). Embora esses achados possam fornecer algumas ideias sobre a patogênese do ZIKV em fetos, os camundongos neonatais não possuem um sistema imunológico totalmente maduro e são altamente suscetíveis à infecção por vírus neurotrópicos (Couderc et al., 2008). Um estudo com camundongos fêmea grávidas, mostrou que as respostas das células T CD4 e T CD8 frente à infecção por ZIKV foram diminuídas em comparação com camundongos fêmea não grávidas. É possível que a diminuição da imunidade mediada por estas células durante a gravidez possa aumentar a disseminação do vírus para o feto, levando à SCZ (Winkler et al., 2017).

Um estudo com camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> demonstrou um papel mais claro para as células T CD8 em causar danos no cérebro e paralisia durante a infecção por ZIKV. A infecção de astrócitos por ZIKV resulta na quebra da barreira hematoencefálica e um grande influxo de células T CD8 efetoras. A atividade antiviral das células T CD8 dentro do cérebro limita a infecção de neurônios por ZIKV, mas, como consequência, induz uma paralisia associada ao ZIKV, que causa a morte dos camundongos. Após a depleção das células T CD8, eles observaram uma diminuição na paralisia e uma melhora na sobrevivência. Quando ambas as células, T CD4 e T CD8, estavam depletadas, os camundongos tinham um fenótipo intermediário com uma diminuição significativa na sobrevivência, sugerindo um papel regulador para as células T CD4 no cérebro. Esse papel regulador foi confirmado quando somente as células T CD4 foram depletadas, o que fez com que todos os camundongos desenvolvessem paralisia e sucumbissem à infecção (Jurado et al., 2018). Outro estudo observou que a depleção das células T CD4 não teve impacto na resposta das células T CD8, mas causou cargas virais significativamente maiores no SNC, o que piorou a doença e diminuiu a sobrevivência dos camundongos (Hassert et al., 2018). Esses estudos demonstraram um papel ativo das células T CD8 na patogênese do ZIKV, enquanto eles descrevem um papel regulador para células T CD4 na infecção.

### **1.11. Microbiota**

O termo microbiota tem sido usado para definir a comunidade de micróbios simbióticos, que incluem bactérias, arqueias, vírus, fungos e protozoários que estabeleceram seus próprios nichos dentro de um hospedeiro, que fornecem funções de apoio a imunidade e ao metabolismo do hospedeiro (Round and Mazmanian, 2009; Kamada et al., 2013). O trato intestinal é o maior reservatório da microbiota no corpo humano (Sender et al., 2016). A microbiota intestinal normalmente consiste em mais de 1000 espécies bacterianas cuja composição permanece relativamente estável em cada indivíduo ao longo da idade adulta, mas é extremamente diversa entre os indivíduos (Kamada and Núñez, 2014). No entanto, várias mudanças como o uso de antibióticos, probióticos, infecções, gravidez e alterações em estilos de vida a longo prazo, podem alterar a composição e a diversidade do microbiota intestinal (Rodríguez et al., 2015).

Recentemente, o interesse pelo papel da microbiota intestinal na saúde humana e nas doenças está crescendo graças às novas tecnologias de meta-análise de genomas microbianos, bem como seus metabólitos produzidos, que estão se tornando cada vez mais viáveis e acessíveis (Qin et al., 2010; Smith et al., 2013). Atualmente, já sabemos que a microbiota intestinal tem papéis essenciais no metabolismo, no desenvolvimento e na regulação do sistema imunológico, bem como na resistência à colonização de patógenos entéricos no intestino do hospedeiro (Kamada et al., 2013). Em adição, perturbações na composição microbiana, denominadas disbiose, podem ter um impacto negativo no sistema imunológico e na proteção do intestino contra infecções oportunistas, contribuindo para o surgimento de várias doenças crônicas e distúrbios inflamatórios no hospedeiro (Kim et al., 2017a).

A microbiota intestinal auxilia na degradação de carboidratos não digeríveis no intestino humano por meio de algumas enzimas digestivas derivadas de bactérias. Para fazer isso, por exemplo, os *Bacteroides* possuem um grande número de genes que codificam enzimas essenciais para degradar diversos carboidratos complexos, e membros dos filos Firmicutes, Actinobacteria e Verrucomicrobium produzem enzimas nutricionalmente especializadas que têm um papel fundamental na degradação de substratos específicos, tais como paredes celulares vegetais, partículas de amido e mucinas (Flint et al., 2012). Além disso, as bactérias intestinais agem como um importante fornecedor de vitaminas juntamente com os alimentos (LeBlanc et al., 2013). Espécies de Bifidobactérias e Lactobacilli são reconhecidas como probióticos capazes de converter compostos dietéticos em vitamina K e a maior parte da vitamina B solúvel em água (Kleerebezem and Vaughan, 2009). Ao mesmo tempo, as bactérias intestinais anaeróbicas produzem ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) como produtos finais da fermentação de fibras, entre as quais, acetato, propionato e butirato são os mais abundantes (den Besten et al., 2013). SCFAs são transportados do lúmen intestinal nos vários tecidos onde são usados como fonte de energia, substratos ou moléculas de sinal, para auxiliar no metabolismo de lipídios, glicose e colesterol (Ríos-Covián et al., 2016).

A microbiota intestinal estabelece uma relação de mutualismo com o hospedeiro, essa relação entre o trato gastrointestinal (TGI) e a microbiota intestinal é favorecida pela

temperatura corporal e a disponibilidade de nutrientes do hospedeiro (Nuding et al., 2013). Pois os microrganismos comensais auxiliam na quebra de carboidratos, na síntese de vitaminas e SCFAs. Desse modo, há benefício tanto para o hospedeiro quanto para os microrganismos, e essa relação só é possível graças ao papel regulador do sistema imune no intestino (Jarchum and Pamer, 2011). Uma função importante do sistema imunológico intestinal é controlar a exposição das bactérias aos tecidos do hospedeiro. Isso ocorre em dois níveis distintos: primeiro, minimizando o contato direto entre as bactérias intestinais e a superfície das células epiteliais (estratificação) e, em segundo lugar, confinando bactérias penetrantes aos locais intestinais e limitando sua exposição ao compartimento imune sistêmico (compartimentalização) (Hooper et al., 2012).

Vários efetores imunológicos funcionam juntos para estratificar os micróbios luminiais e minimizar o contato epitelial bacteriano. As células caliciformes intestinais secretam mucinas, glicoproteínas, que se agrupam em uma camada viscosa de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de espessura na superfície da célula epitelial intestinal (Johansson et al., 2008). Já a compartimentalização depende em parte de proteínas antimicrobianas secretadas pelo epitélio intestinal como as  $\alpha$ -defensinas (Salzman et al., 2003) e RegIII $\gamma$  (Cash et al., 2006), IgA secretada pelos plasmócitos da lâmina própria (Macpherson and Uhr, 2004b) e da ação de células apresentadoras de antígeno, linfócitos B e T (Macpherson and Uhr, 2004a).

A microbiota intestinal é uma importante fonte de antígenos bacterianos. Esses antígenos, que podem ser tanto de bactérias comensais quanto de bactérias patogênicas, são reconhecidos por PRRs das células epiteliais ou das APCs, e podem desencadear dois tipos de resposta imune, uma resposta ativa protetora contra bactérias patogênicas ou uma resposta passiva de tolerância imunológica e controle da inflamação (Rescigno, 2011). Dessa maneira, a microbiota intestinal possui a capacidade de modular a imunidade de mucosa para manter a homeostase no hospedeiro (Belkaid and Hand, 2014).

Outra função importante recém descoberta da microbiota intestinal é sua capacidade de regular o funcionamento normal do cérebro, o eixo microbiota-intestino-cérebro tem sido cada vez mais estudado para entender a patogênese, a prevenção e o tratamento de doenças mentais, incluindo ansiedade e depressão (Foster and McVey Neufeld, 2013), doença de Parkinson (Mulak and Bonaz, 2015), doença de Alzheimer (Kowalski and Mulak, 2019), transtorno do espectro do autismo (TEA) (Srikantha and Mohajeri, 2019), esclerose múltipla (Camara-Lemarroy et al., 2018), entre outras desordens neurológicas.

O intestino pode interagir com o cérebro por meio do sistema nervoso entérico (SNE), que é composto por complexas redes neurais e gliais. O SNE está situado entre as camadas musculares circulares internas e longitudinais externas do intestino e controla principalmente a motilidade intestinal (Furness, 2012). O intestino pode interagir com o cérebro por meio de duas vias neuroanatômicas. A primeira é a troca mútua de informações diretamente entre o intestino e o cérebro pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e o nervo vago (NV) na medula espinal, A outra via é uma comunicação

bidirecional entre intestino e cérebro por meio da comunicação entre o SNE no intestino e SNA-NV na medula espinhal (Rao and Gershon, 2016; Wang and Wang, 2016).

Entre os vários tipos de infecções patogênicas do hospedeiro, as infecções virais constituem um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo. Durante o processo de infecção, os vírus podem ter interações substanciais e íntimas com a microbiota intestinal do hospedeiro (Karst, 2016). Uma infinidade de evidências sugere que a microbiota intestinal regula, e por sua vez, é regulada por infecções virais, por meio de diversos mecanismos (Li et al., 2019). Sendo assim, a microbiota intestinal pode ter papel dúbio nas infecções virais, ora sendo estimulador, ora sendo inibidor (Berger and Mainou, 2018). Além disso, a integridade da microbiota intestinal pode ser modulada por infecções virais, causando disbiose no hospedeiro e influenciando ainda mais a infectividade viral.

## 2. Justificativa

A infecção pelo ZIKV é considerada uma doença emergente e endêmica devido ao grande número de casos notificados e à sua rápida dispersão por diversos locais no mundo. Graças a sua capacidade de provocar danos neurológicos, como a SCZ e/ou desenvolvimento da SGB, pesquisadores do mundo todo correm contra o tempo a fim de entender a patogênese do ZIKV e, concomitantemente, buscar um tratamento viável e acessível para produzir uma vacina eficaz contra o ZIKV.

Diversos estudos como modelos de camundongos imunocomprometidos foram importantes para descobrir a patogênese do ZIKV (Winkler and Peterson, 2018), entretanto, sabemos que modelos imunocompetentes são mais fidedignos ao que realmente acontece em infecções humanas (Bradley and Nagamine, 2017). Embora o ZIKV nesses modelos não cause uma infecção aguda, estudos com análises mais posteriores mostraram que o ZIKV pode se replicar em cérebros de camundongos adultos, podendo levar a morte celular, prejudicar as sinapses e a memória (Figueiredo et al., 2019). Entretanto, a necessidade de avaliar os déficits cognitivos como uma comorbidade potencial em camundongos adultos infectados pelo ZIKV ainda se faz necessária, assim como os mecanismos e o tropismo do ZIKV no cérebro *in vivo*.

Em razão desse tropismo do ZIKV pelo cérebro e das consequências que a infecção pelo ZIKV pode levar ao indivíduo, decidimos analisar o cérebro de camundongos adultos imunocompetentes infectados pelos ZIKV, por meio da análise de proteômica, a hipótese é de que a infecção pelo ZIKV pode levar a modulação do perfil de proteínas cerebrais, e essas, por sua vez, podem causar futuras comorbidades ou danos a esses camundongos.

Outro fator interessante a ser investigado é o eixo microbiota-intestino-cérebro, nenhum estudo demonstrou ainda a relação da infecção do ZIKV com a microbiota intestinal. Alguns poucos estudos demonstraram que, em camundongos imunocomprometidos, a rota anal pode ser uma porta de entrada para a infecção, a proliferação e a disseminação do ZIKV e que esse também pode ser eliminado pelas fezes (Li et al., 2018a; Martínez et al., 2020). Outro estudo com diversos Flavivírus demonstrou que a infecção pelo ZIKV induz uma dismotilidade gastrointestinal e um dilatamento intestinal em camundongos imunocomprometidos (White et al., 2018).

Um único estudo que embora não tenha focado especificamente em ZIKV, mas sim em WNV, mostrou que o tratamento com antibióticos orais aumentou o risco de doença grave durante a infecção por Flavivírus em camundongos e demonstrou um papel potencial para as comunidades microbianas hospedeiras na promoção de respostas de células T antivirais durante a infecção sistêmica por WNV (Thackray et al., 2018).

Portanto, sabendo que o ZIKV tem tropismo pelo cérebro e SNC, consegue infectar, proliferar e causar uma infecção colón-anal e que a depleção da microbiota intestinal pelo uso de antibióticos orais pode levar a infecções mais graves causadas por Flavivírus em camundongos, fomos investigar se a infecção por ZIKV pode modular a microbiota

intestinal de camundongos imunocompetentes e, em caso positivo, quais os efeitos que essa modulação pode causar no camundongo.

Dentre as descobertas de mecanismos de escape imunológico do ZIKV, a super expressão da caspase1 e a ativação do inflamassoma NLRP3 inibindo a ação da resposta antiviral mediada pelo IFN-I (Zheng et al., 2018) chamou a atenção. Vários estudos já deixaram claro que o ZIKV induz a ativação do inflamassoma NLRP3, e induz inflamação em diversos modelos *in vitro* (Tricarico et al., 2017; He et al., 2018; Wang et al., 2018). Em adição, um dos mecanismos pelo qual o ZIKV pode induzir a microcefalia, veio de um estudo recente, que demonstrou que o ZIKV leva à morte por piroptose de NPCs *in vitro* e *in vivo*, mediados pela ação da Caspase-1 e da Gasdermina-D, o que levou à atrofia cerebral em camundongos neonatos (He et al., 2020).

Sabendo da importância da Caspase-1 e do inflamassoma NLRP3 na inflamação e no escape imunológico induzido pelo ZIKV. Decidimos investigar como seria a infecção do ZIKV em modelos de camundongos nocautes para essas duas proteínas. A hipótese, seria de que as ausências dessas duas proteínas pudessem tornar os camundongos mais imunocompetentes, atenuando a inflamação e danos causados pela infecção.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Geral:

- Analisar se a infecção pelo ZIKV induz modulação na microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes e caracterizar a patogênese da infecção causada pelo ZIKV nestes camundongos, investigando o papel das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 neste processo

#### 3.2. Específicos:

- Averiguar se a infecção pelo ZIKV modula a  $\alpha$ - e  $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes;
- Caracterizar a abundância relativa dos filos e famílias da microbiota intestinal que foram modulados pela infecção por ZIKV;
- Avaliar os efeitos da modulação da microbiota induzida pela infecção do ZIKV no cólon dos camundongos, através da detecção de citocinas e de análises histopatológicas;
- Avaliar o efeito da infecção por ZIKV na carga viral, peso e glicemia dos camundongos selvagens imunocompetentes e o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11;
- Caracterizar o perfil de citocinas séricas em camundongos selvagens infectados por ZIKV, bem como o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11;
- Investigar se a infecção por ZIKV induz esplenomegalia e recrutamento de macrófagos e linfócitos para o baço dos camundongos selvagens imunocompetentes, bem como o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 nesse contexto;
- Averiguar se a infecção por ZIKV induz dano e inflamação no cérebro de camundongos selvagens através da detecção de citocinas e análises histopatológicas dos cérebros, bem como investigar o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 nesse contexto;
- Analisar se camundongos selvagens imunocompetentes infectados por ZIKV apresentam modulação no perfil proteômico cerebral, assim como o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 nesse contexto.

## 4. Metodologia

### 4.1. Animais e Comitê de Ética

Foram usados camundongos C57BL/6J e os derivados de C57BL/6J, Caspases-1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> entre oito e dez semanas de vida. Todos os camundongos foram criados e mantidos sob condições específicas, em ambiente livre de patógenos, em micro isoladores ventilados, com água e alimento ad libitum, sob ciclo de luz e escuridão de 12/12h, mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. O cuidado com os camundongos estava em conformidade com as diretrizes institucionais sobre ética em experimentos com animais aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDoc n° 12/2017 (Anexo I).

### 4.2. Linhagens celulares utilizadas

- VERO: Linhagem de células derivadas de tecido epitelial do rim de macaco (*Cercopithecusaethiops*). Foram cultivadas com meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótico-antimicótico em estufa úmida a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.
- BHK-21: Células derivadas de fibroblastos do rim de hamster (*Mesocricetusauratus*). Foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótico-antimicótico em estufa úmida a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.
- C6/36: Células da larva de mosquito (*Aedes albopictus*). Foram cultivadas em meio TC100 suplementado com 10% SFB e incubados em uma estufa a 37 °C sem a presença de CO<sub>2</sub>.

### 4.3. Expansão do Zika Vírus

A cepa viral do Zika Vírus, ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1), utilizada nesse trabalho é de origem brasileira, isolada do soro de um paciente em fase aguda no estado do Pernambuco durante o período do surto em que ocorreu na região Nordeste, cedida pelo Dr. Rafael Freitas de Oliveira França (FIOCRUZ, PE, Brasil). Inicialmente o vírus foi propagado uma vez em células C6/36 e mais duas vezes em células VERO. Para a propagação viral a confluência das células a serem infectadas estava em cerca de 70%. Um dia antes da infecção, a concentração de SFB no meio de cultura foi reduzida para 2%. Uma alíquota de ZIKV-PE243 foi utilizada para infectar as células e, seis dias após a infecção ou a percepção do efeito, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 4°C a 300g (1800rpm) durante 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado em seringas com filtros de 22 µM e posteriormente congelado gerando o estoque viral.



#### **4.4. Titulação do Zika Vírus**

Para a titulação viral foram utilizadas as células BHK-21, essas foram plaqueadas,  $10^5$  células por poço em placas de 24 poços com meio de cultura com 2% SFB. Para realizar a infecção das placas, foram feitas 10 diluições virais. Após o período de 2 horas de infecção, o sobrenadante foi descartado e o meio semi-sólido [DMEM + SFB 2% + 2,9 % Carboximetilcelulose (CMC)] foi adicionado nos poços e a placa incubada a 37°C durante o período de 6 dias, em seguida o meio semi-sólido foi retirado e adicionado o fixador formalina 3,7% para a fixação das células que foram incubadas overnight na geladeira a 4°C. Após a fixação, foi adicionado o corante Cristal violeta pelo período de 3h para fazer a coloração das células, então a placa foi lavada em água destilada, após a secagem foi realizada a contagem dos spots. Para o cálculo da titulação viral é feita a contagem dos spots resultantes dos poços em triplicata e feita à média aritmética entre eles, depois de a média ser feita essa é inserida na fórmula:  $P \times F \times 10^x$  PFU/mL em que P é a média do número de placas, F é o fator de correção para expressar o título de PFU/mL ( $1000 \mu\text{L}/\text{volume do inóculo}$ ) e 10x diluições que as unidades de placas foram formadas.

#### **4.5. Infecções *In vivo***

Para as infecções *in vivo*, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente) por injeção intramuscular na pata dianteira, seguida por inoculação intraperitoneal (i.p) ou intravenoso (i.v) de  $1.10^5$  PFU/ml de ZIKV e como controles não infectados foi inoculado meio DMEM no mesmo volume que a inoculação de ZIKV, 100  $\mu\text{L}$  intravenoso (i.v) e 500  $\mu\text{L}$  intraperitoneal (i.p). Dentro do período de infecção, coletas de sangue foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 14, para isso, os animais foram devidamente anestesiados e o sangue coletado pela veia facial. Após 14 dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, os órgãos de interesse foram coletados e em seguida as seguintes análises foram realizadas.

#### **4.6. Carga viral por RT-PCR**

##### **4.6.1. Extração de RNA**

O cérebro foi retirado dos camundongos após 14 dias de infecção, separado cerca de 20mg de tecido, que foi macerado a seco com auxílio de almofariz e pistilo em nitrogênio líquido. Quando o conteúdo macerado apresentou consistência de um pó fino, esse foi transferido para um eppendorf, onde foi adicionado 1mL de trizol e homogeneizado em vórtex por 30seg. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e o tubo foi agitado vagarosamente por 15 seg. Incubou-se em temperatura ambiente por mais 5min e centrifugou-se a  $14000g/4^\circ\text{C}$  durante 15 min. A fase aquosa, que contém o RNA, foi então coletada e, em seguida, passou pelo processo de extração e purificação de RNA viral com o kit Manual RNeasy Mini (QIAGEN) seguindo-se as instruções do

fabricante. Brevemente, a fase aquosa foi retirada e direcionada para a etapa de lise com o tampão RLT proveniente do kit de extração. Após centrifugação a 14000g/4°C por 3 minutos o conteúdo foi transferido para um novo tubo contendo 1mL de etanol 70% diluído em água livre de RNase e, após a homogeneização, o lisado passou para etapa de isolamento usando as colunas de spin RNeasy. Depois que todo o volume de lisado foi passado pelas colunas, iniciou-se o processo de lavagem com tampão RW1 e RPE. Com a efetivação das etapas de lavagem, o RNA foi eluído das colunas de sílica com 30µL de água livre de RNase e armazenado em freezer -70°C.

A extração do RNA viral de células e soro foi feita utilizando o kit de extração QIAampR Viral RNA (QIAGEN) seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, 140 µL dos sobrenadantes de célula ou do soro foram adicionados a 560 µL do tampão AVL, incubados à temperatura ambiente por 10 min. e, então, foram adicionados 560 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e o volume total da amostra foi aplicado na coluna de sílica (em duas vezes de 630 µL), que foi centrifugada. Foram feitas duas lavagens da coluna com os tampões AW1 e AW2 para retirada de outros componentes celulares e possíveis resíduos. O RNA viral foi eluído com 30 µL de tampão AVE e armazenado a -70°C.

#### **4.6.2. RT-PCR**

Esta etapa foi realizada no Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF) seguindo protocolo previamente publicado (Lanciotti et al., 2008). Numa microplaca óptica (PE AppliedBiosystems – Foster City, California, EUA), de 96 micropoços, foram adicionados 20µL da mistura e reagentes, conforme a Tabela 1, em cada poço. Logo após, foram acrescentados 5µL do RNA extraído, obtendo, assim, um volume final de 25µL/reação. Cada amostra e controles foram aplicados em duplicatas. Após a montagem da placa, colocou-se um filme, do inglês “OpticalAdhesive Cover”, (PE AppliedBiosystems - Foster City, California, EUA), na parte superior para selagem. Logo em seguida, a placa selada foi levada para uma centrífuga, e colocada na opção de “spin”, as amostras foram amplificadas utilizando o StepOne Real Time PCR Systems (AppliedBiosystems), seguindo as condições de amplificação do aparelho.

Como controle positivo, foram usados antígenos virais retirados de cérebro de camundongos imunossuprimidos; o housekeeping gene foi para RNase P; e o controle negativo foi soro previamente diagnosticado negativo para ZIKV. Para a interpretação dos resultados, o ciclo limiar (Ct) de cada reação foi considerado como positivo para valores de Cts entre 01 e 37, e negativo acima de 38. A carga viral foi definida com base em uma diluição seriada do ZIKV que expandimos e fizemos como estoque que foi previamente titulado por PFU.

**Tabela 1 - Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR.**

Item	Concentração	Volume
Master Mix	2x	12,5µL
Água	-	1µL
Primer F	10 µM	1 µL
Primer R	10 µM	1 µL
Sonda	2 µM	1 µL
Primer RP1	10 µM	1 µL
Primer RP2	10 µM	1 µL
Sonda RP	2 µM	1 µL
Enzima	50x	0,5 µL
Amostra	-	5 µL
Total	-	25 µL

**Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cDNA para amplificação dos fragmentos do gene do envelope do ZIKV.**

Primer	Posição no Genoma	Sequência
ZIKV 1086	1086-1102	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162c	1162-1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV 1107-FAM	1107-1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACATCAA

#### 4.7. Extração de Proteínas

As proteínas do cérebro e intestino foram extraídas utilizando tampão de lise celular (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 1 % de Triton X -100 – pH 7,4) contendo inibidor de protease, com o auxílio de Almofariz e Pistilo. Para manter a integridade das proteínas contidas no lisado, este foi mantido em gelo e intensamente homogeneizado por 30 minutos em intervalos de 5 minutos entre cada agitação. Ao fim do processo de extração de proteínas totais, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14000g por 15 minutos em um processo de clarificação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e distribuído em três tubos de eppendorfs por condição experimental.

#### 4.8. Dosagem de Citocinas ELISA

As citocinas provenientes do soro e dos extratos proteicos do cérebro e intestino dos camundongos infectados foram analisadas pelo método de ELISA, utilizando-se kits comerciais (eBioscience e R&D System). No ensaio de Elisa, uma placa de 96 poços foi revestida com anticorpos monoclonais específicos de captura, incubada overnight em 4°C. Após esse período, a placa foi lavada 3x com PBS/Tween 0,05% e bloqueada com 100µl de PBS/BSA 1% durante 1h. Após esse período, 50 µl das amostras e a curva padrão foram adicionadas à placa e incubadas overnight em 4°C. Em seguida, a placa foi lavada 3x com PBS/Tween 0,05%, o anticorpo de detecção

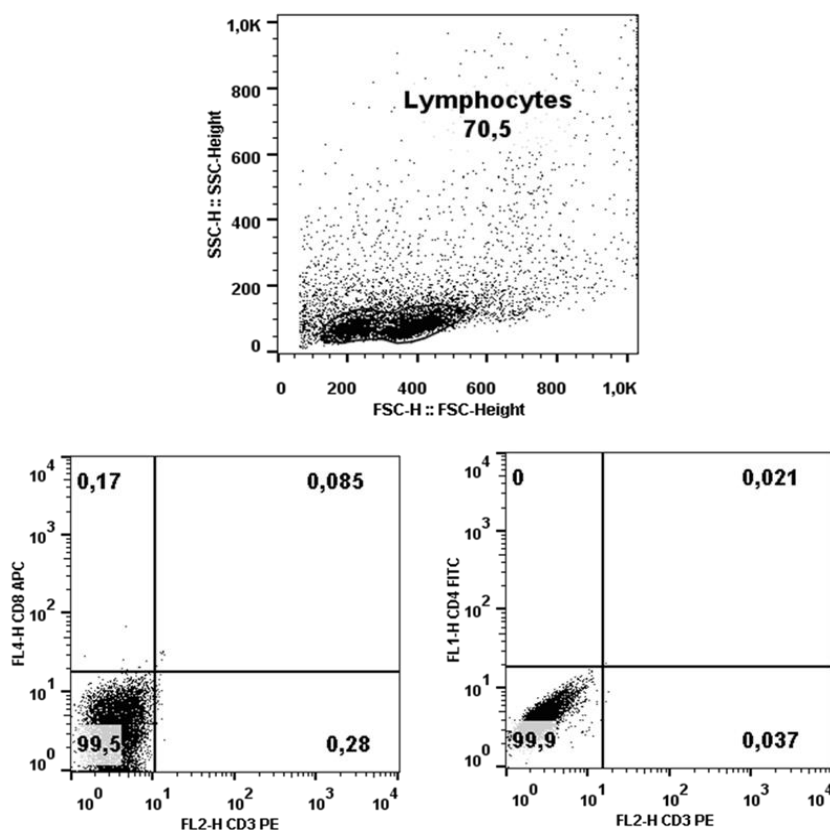
específico de cada citocina foi adicionado e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 1h. A placa foi então lavada mais 3x e a enzima Estreptavidina-HRP foi adicionada e incubada por 30 min a temperatura ambiente, a placa foi lavada mais 5x e o substrato (avidina-peroxidase) foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 10 min. O reagente de revelação foi adicionado e a leitura da placa foi realizada em leitora de Elisa a 450 nm. Os dados foram analisados por meio do programa SoftMaxPro, com os cálculos baseados na curva padrão e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL).

#### **4.9. Histologia**

Os baços, cólons e os cérebros dos camundongos foram coletados, lavados cuidadosamente com tampão PBS e fixados em 10% de formalina. Depois disso, os tecidos foram desidratados e embebidos em parafina. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Sigma) seguindo procedimento padrão (Feldman and Wolfe, 2014). As seções foram examinadas por microscópio óptico Zeiss Lab. As fotomicrografias e cores A1 AxioCam 105 foram digitalizadas utilizando o programa ZEN da Zeiss. As amostras de intestino foram bem orientadas com criptas cortadas longitudinalmente para avaliar com precisão as alterações na arquitetura geral do tecido intestinal.

#### **4.10. Citometria**

O baço dos camundongos foi lavado com PBS e dissociado utilizando uma rede porosa. Os esplenócitos foram coletados em tubos eppendorfs, lavados 1x com PBS, e submetidos por 1 min à solução de lise de hemácias, logo depois, foram lavados com PBS + 5% de SFB. Para a marcação intracelular, foi usado um inibidor do transporte intracelular, 10 µg/mL de Brefeldina A (Invitrogen), por 3h, a 37°C na estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram lavadas 1x com solução de lavagem e em seguida permeabilizadas com saponina 0,1% e marcadas por 30 min a 4°C para detecção de IFN-γ (APC). Para as marcações de superfície os esplenócitos foram incubados com as soluções dos seguintes anticorpos: anti-CD3 (PE), anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (APC), F4/80 (FITC), MHC-II (PE-Cy5), CD1d (PE) e a sonda Bodipy (FITC) por 30 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3x com solução de lavagem e ressuspensas em 500µL de solução fixadora (1% de paraformaldeído em PBS). Os esplenócitos foram analisados por citometria de fluxo (FACS Calibur) e adquiridos 50000 eventos por amostra. O gate foi plotado na população de células viáveis, excluindo-se os debris celulares da análise, como mostrado na Figura 07. Os histogramas e as análises de porcentagem de células positivos foram feitos no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).



**Figura 7 - Estratégias de gate e análises de citometria.** Histogramas representando os controles não marcados das marcações de CD3, CD4 e CD8.

#### 4.11. Análise da microbiota intestinal

##### 4.11.1. Isolamento de DNA de amostras fecais

As amostras de fezes foram coletadas no 14<sup>o</sup> dia após a infecção, para o isolamento do DNA foi usado o kit de isolamento de DNA MoBioPowerSoil. O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, 250mg de amostra e 60µL da solução C1 foram adicionados em tubo próprio contendo beads, aquecidos por 10 min a 65°C e agitadas horizontalmente durante 10 minutos com o uso de vórtex. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 30 segundos ao sobrenadante, foram adicionados 250µL da solução C2. Em seguida, as amostras foram agitadas por 5 segundos com a utilização de vórtex e incubadas a 4°C por 5 minutos. 200µL da solução C3 foram adicionados em um volume máximo de 600µL de sobrenadante e brevemente agitado. As amostras foram novamente incubadas a 4°C por 5 minutos e centrifugadas a 10000g por 2 minutos. A 750µL de sobrenadante obtido durante a centrifugação foram adicionados 1200µL da solução C4 e agitados em vórtex por 5 minutos. A amostra foi adicionada a tubo próprio contendo um filtro, o qual foi centrifugado a 10000g por 1 minuto e o líquido descartado. 500µL da solução C5 foram adicionados ao filtro, o qual foi centrifugado a 10000g por 30 segundos e o líquido novamente descartado. Ao centro do filtro foram

adicionados 50µL da solução C6. As amostras foram então centrifugadas a 10000g por 30 segundos e o produto de filtração foi quantificado em NanoDrop, comparando o valor de absorvância a 260nm com os valores encontrados em 230 e 280nm. Após quantificação, as amostras foram estocadas a -20°C.

#### **4.11.2. Amplificação do DNAr 16s por PCR**

A PCR foi realizada em placa de 96 poços em ambiente estéril a fim de se evitar que moléculas de DNA e RNA livres no ambiente pudessem interferir no procedimento. O Mastermix, o DNA a ser amplificado e os primers foram centrifugados a 500g por 1 minuto. 88µL de Mastermix foram transferidos para as colunas 1, 5 e 9 da placa. 8µL de primers foram adicionados às mesmas colunas. Colunas 4, 8 e 12 foram usadas como controle negativo do experimento e não continham o DNA molde a ser amplificado. A cada poço das colunas 1, 5 e 9 foram adicionados 3µL do DNA molde. Em seguida, a placa foi selada e posta no termociclador. O programa “PTPCR” foi utilizado para obtenção de amplicon. Tendo em vista avaliar a eficiência do processo da PCR e a qualidade das amostras, os produtos de PCR foram analisados utilizando eletroforese em gel de agarose. As réplicas das amostras foram aplicadas na placa, assim como as réplicas de controles negativos. 5µL do pool dos produtos de PCR foram transferidos para outra placa contendo 1,5µL de tampão de amostra. As amostras foram aplicadas em um gel de agarose 1,5%, contendo 3 µL de Sybrgreen, juntamente com 5µL de marcador de massa molecular (100 pb) e foram corridas a 120 V por 40 minutos.

#### **4.11.3. Sequenciamento por Illumina (V4)**

Uma vez comprovada a qualidade das amostras e o seu potencial de amplificação, as amostras foram enviadas para a facilitate GenomeQuébec em um volume de 10-25 µL, a depender da concentração de DNA, para realização do sequenciamento dos primers ILR1SEQ, ILR2SEQ, ILIDXSEQ.

#### **4.11.4. Análise filogenética**

Uma vez realizado o sequenciamento, os dados foram enviados pela empresa e processados no Software Qiime para análise de diversidade e abundância filogenética nas amostras.

### **4.12. Análise de Proteômica**

#### **4.12.1. Preparo da amostra**

Cada amostra foi submetida ao processo de lise celular por aquecimento (80°C/10 min) e sonicação (5 ciclos de 15s a 60% da potência) em tampão composto

por SDS 2%, DTT 0,1 mol/L, TEAB 0,02mol/L. Os extratos proteicos foram submetidos à substituição de tampão (por ureia 8 mol/L, TEAB 0,02 mol/L pH 8,5), redução (DTT 0,1 mol/L), alquilação (iodoacetamida 0,05 mol/L) e digestão (tripsina 1:100 em TEAB 0,02 mol/L, pH 7,9 por 9h). Os peptídeos obtidos foram dessalinizados em micro colunas C-18 e quantificados usando-se o sistema Qubit.

#### **4.12.2. Cromatografia e espectrometria de massa**

Os peptídios obtidos foram injetados em sistema cromatográfico (DionexUltimate 3000 RSLCnano UPLC, Thermo, USA), configurado com coluna de aprisionamento (trapcolumn) de 3 cm x 100  $\mu$ m, contendo partículas de C18 5  $\mu$ m, 120 Å (ReposilPur, Dr. MaichGmbH), conectada em série à coluna analítica de 24 cm x 75  $\mu$ m, contendo partículas de C18 3  $\mu$ m, 120 Å (ReposilPur, Dr. MaichGmbH). As amostras foram injetadas de forma a se obter 1 $\mu$ g na coluna, submetidas a gradiente linear de eluição entre solventes A (ácido fórmico 0,1% em água) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) de 2% B a 35% B durante 155 min.

As frações separadas no sistema cromatográfico foram eluídas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo, USA), configurado para operar em modo DDA (aquisição dependente de dados), sendo que os espectros de MS1 foram adquiridos no analisador orbitrap, com resolução de 120000 e faixa de m/z entre 300 e 1650. Os 20 íons mais intensos, acima do limite de intensidade de 3000, foram fragmentados, gerando espectros de MS2, no analisador íon trap por dissociação induzida por colisão (CID). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica, favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes.

#### **4.12.3. Análise de dados**

Os espectros obtidos foram analisados de forma qualitativa e quantitativa, de forma a permitir a identificação do conjunto total de proteínas detectáveis nas amostras, bem como avaliar quantitativamente as proteínas que apresentaram abundância relativa significativamente diferente entre as condições. Estas proteínas foram analisadas em maior detalhe, fornecendo informações sobre os componentes que melhor distinguem entre as condições e agrupadas quanto a vias e a interações.

Os espectros foram analisados com auxílio do programa Progenesis QI for Proteomics (Waters, USA), com o qual foi realizado o alinhamento dos cromatogramas, a quantificação por área dos picos extraídos (XIC – extractedionchromatogram), normalização e análise estatística (ANOVA) dos eventos de MS1. Os eventos significativamente diferentes (p-valor <0,05) tiveram seus espectros de MS2 submetidos à identificação utilizando-se o programa Peaks versão 7.0 (BSI, USA), para busca no banco de dados obtido do repositório Uniprot em maio de 2017, filtrado para a espécie *Mus musculus*, tax. ID 10090, submetido à

remoção de sequências redundantes utilizando-se o software FASTAtools. A busca foi realizada com base em sequenciamento de novo e em PSM, considerando FDR < 1%, pelo menos 1 peptídeo exclusivo, com tolerância para a massa do precursor de 10 ppm, e dos fragmentos de 0,5Da tolerância de até 2 clivagens perdidas, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Além disso, foram ativados os módulos de busca por modificações do banco Unimod com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais. Após a inferência de proteínas, a quantificação foi refinada considerando a média dos peptídios atribuídos a cada proteína e foram realizadas as análises estatísticas em nível de proteínas, sendo consideradas reguladas as proteínas que apresentaram ANOVA p-valor <0.05. Tais proteínas foram submetidas à análise multivariada de PCA e agrupamento em clusters de acordo com os perfis de abundância relativa.

Como critério adicional de estringência, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos, utilizando-se na segunda etapa de análise estatística a plataforma MetaboAnalyst (Chong et al., 2018). As interações foram analisadas pelo programa String (Szklarczyk et al., 2017), e as vias moleculares pelo Reactoma e Panther (Mi et al. 2013; Mi et al. 2017). Para essas etapas o mapeamento dos códigos de acesso das proteínas para códigos de genes, foram utilizadas as plataformas de mapeamento do próprio Uniprot e DB2DB em BioDBnet (Mudunuri et al., 2009).

#### **4.13. Análise Estatística**

Para determinar as diferenças entre as condições não infectado (NI) e ZIKV foi utilizado o teste Mann-Whitney para as comparações dos grupos experimentais, WT, Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> foi utilizada a análise da variância 2 - Away - ANOVA, seguida pelo método Turkey (pós-teste), realizado no programa estatístico GraphPadPrism, versão 7.0 (GraphPad Software, EUA, 2018). Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os gráficos e tabelas mostram os valores das replicatas  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).



## 5. Resultados

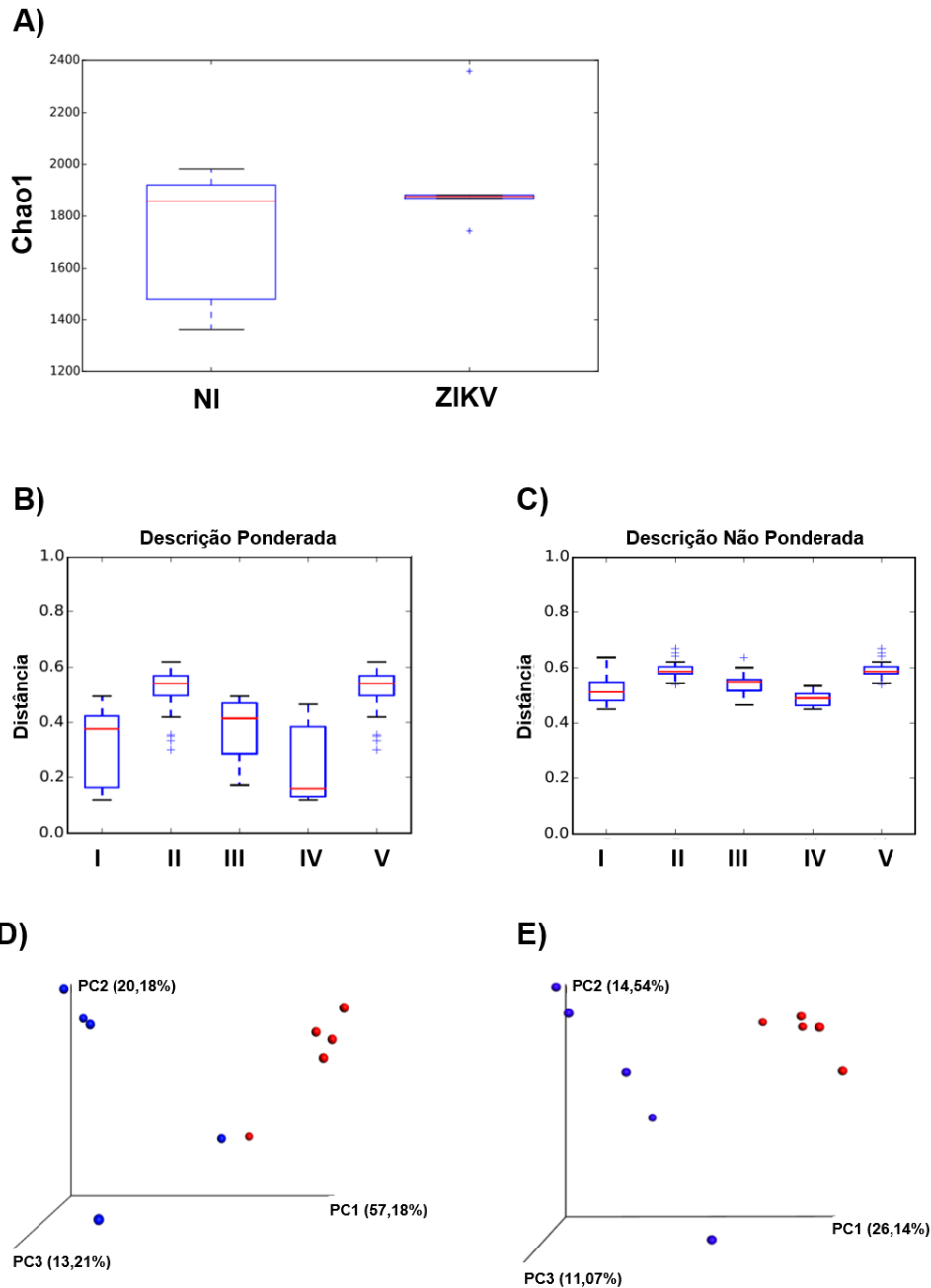
### 5.1. A infecção pelo ZIKV alterou a $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes

O nosso primeiro objetivo foi verificar se a infecção pelo ZIKV induziria a uma modulação da microbiota intestinal em camundongos imunocompetentes. Sendo assim, ao final da infecção, coletamos as fezes dos camundongos, extraímos o DNA, amplificamos o DNA16S e enviamos esse material para a facility Genome Québec, para o sequenciamento e análises filogenéticas.

A  $\alpha$ -diversidade se refere à diversidade de comunidades microbianas dentro de uma única condição particular (infectado ou não infectado), enquanto a  $\beta$ -diversidade descreve a diferença em comunidades microbianas entre as condições (comparação entre os grupos) (Goodrich et al., 2014). Usando o Qiime, um software de análise de sequenciamento da diversidade microbiana (Caporaso et al., 2010), quantificamos a diversidade microbiana intestinal dentro de cada grupo de camundongos imunocompetentes não infectados (NI) e infectados com ZIKV (ZIKV) ( $\alpha$ -diversidade), onde o grupo infectado por ZIKV apresentou uma menor diversidade (Figura 8A).

A análise da variação da composição das espécies bacterianas entre os diferentes grupos de camundongos ( $\beta$ -diversidade) forneceu uma medida de distância e dissimilaridade entre as amostras. A  $\beta$ -diversidade pode ser classificada em índices quantitativos (UniFrac ponderado) ou qualitativos (UniFrac não ponderado) (Goodrich et al., 2014). Constatamos que a infecção pelo ZIKV induziu um agrupamento das amostras, mostrando que, após a infecção, ocorre uma diminuição na distância entre as amostras, ou seja, as amostras são mais semelhantes. Caracterizamos também, a proximidade filogenética entre a microbiota intestinal das amostras na análise quantitativa, UniFrac ponderada (Figura 8B), e na análise qualitativa, demonstrada pelos dados UniFrac não ponderados (Figura 8C).

As coordenadas principais (PCs) explicam uma certa fração da variabilidade, observada no conjunto de dados, e são plotadas para criar uma representação visual das diferenças de composição da comunidade microbiana entre as amostras (Goodrich et al., 2014). Os valores de PCs do Unifrac ponderado (Figura 8D) foram maiores em comparação com os valores de PC do Unifrac não ponderado (Figura 8E), o que sugere que a abundância relativa é mais importante do que a riqueza taxonômica. Considerando no Unifrac ponderado, que leva em consideração a abundância relativa da taxa bacteriana, limitando assim o impacto de bactérias de baixa abundância, observamos que o agrupamento de amostras de comunidades microbianas intestinais é mais evidente nos camundongos infectados com ZIKV, com um valor de distância menor (Figura 8B) e maiores valores de coordenadas principais (Figura 8D).

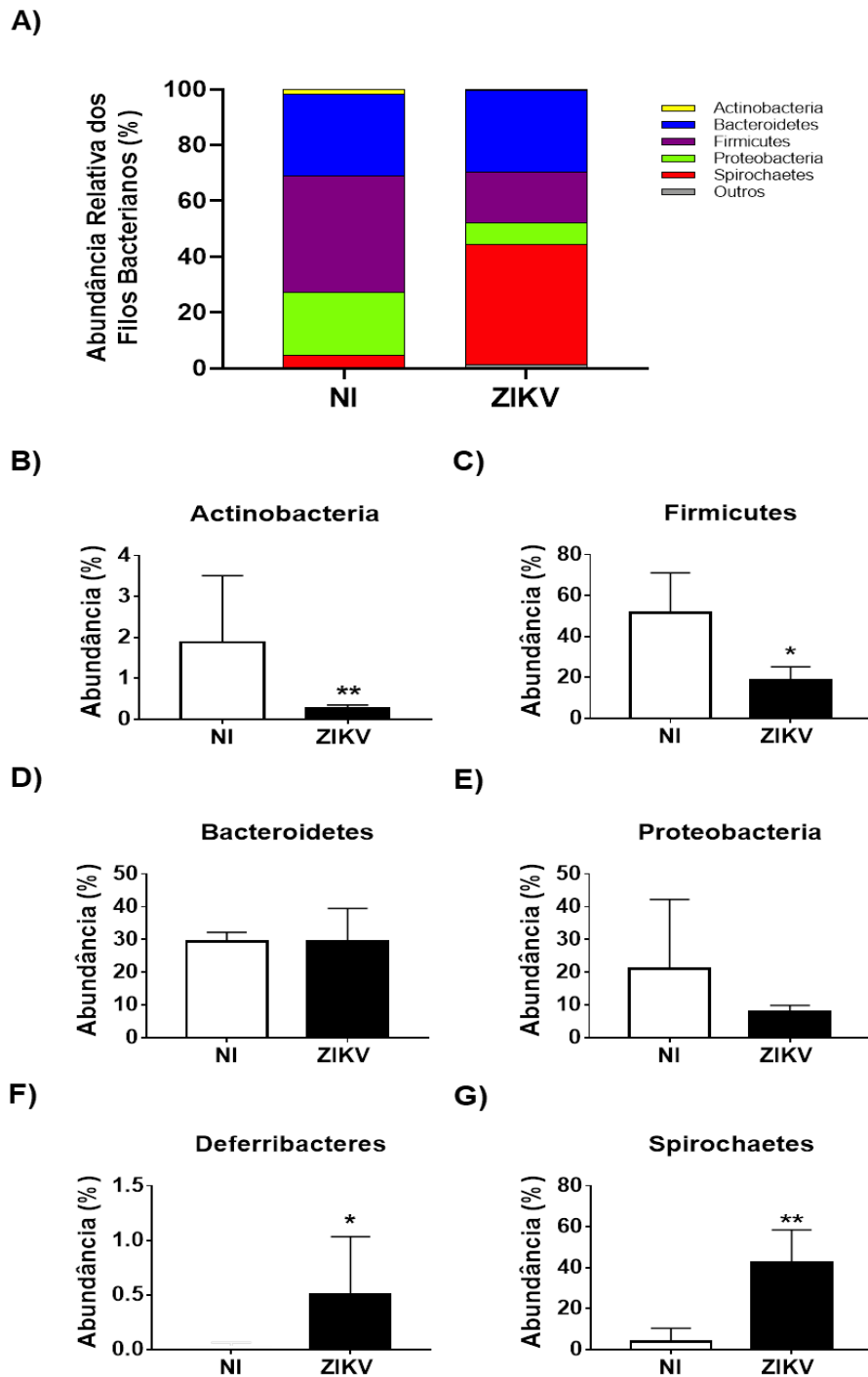


**Figura 8 - O ZIKV induz uma modulação na  $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes.** Camundongos C57BL/6J (WT) de oito semanas foram infectados i.v com  $10^5$  PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. As fezes foram coletadas e enviadas para a análise da microbiota intestinal. (A) Análise da  $\alpha$ -diversidade prevista pelo estimador Chao1 nas condições não infectado (NI) vs. ZIKV,  $p = 0,222$ . Análise da  $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal. Boxplots de distância de UniFrac (B) ponderado (C) e não ponderado: I — Todos dentro da descrição, II — Todos entre a descrição, III — Não infectado vs. Não infectado, IV — ZIKV vs. ZIKV e V — Não infectado vs. ZIKV. (D) UniFrac ponderado do gráfico PCoA e (E) UniFrac não ponderado do gráfico PCoA. A condição NI está representada pelas bolas azuis e as bolas vermelhas representam a condição ZIKV. Análise realizada com o  $N = 5$  por condição. A significância foi testada usando um teste t de duas amostras de Student bilateral; os valores de  $p$  não paramétricos foram calculados com correção de Bonferroni. Valores de  $p$  para comparações de boxplots de distância (B): I vs. II  $p = 0,010$ , I vs. III  $p = 1$ , I vs. VI  $p = 1$ , I vs. V  $p = 0,010$ , II vs. III  $p = 0,010$ , II vs. IV  $p = 0,010$ , II vs. V  $p = 1$ , III vs. IV  $p = 0,420$ , III vs. V  $p = 0,010$ , e IV vs. V  $p = 0,010$ ; (C): I vs. II  $p = 0,010$ , I vs. III  $p = 1$ , I vs. VI  $p = 1$ , I vs. V  $p = 0,010$ , II vs. III  $p = 0,010$ , II vs. IV  $p = 0,010$ , II vs. V  $p = 1$ , III vs. IV  $p = 0,080$ , III vs. V  $p = 0,030$  e IV vs. V  $p = 0,010$ .

## **5.2. A infecção pelo ZIKV diminuiu a abundância dos filos Actinobacteria e Firmicutes da microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes**

Ao constatarmos que a infecção pelo ZIKV leva a uma modulação da  $\beta$ -diversidade, e que a abundância relativa das bactérias é mais relevante do que a riqueza taxonômica entre as condições analisadas, fomos então analisar a abundância relativa dos níveis taxonômicos. Iniciamos a análise por filos bacterianos.

A análise taxonômica identificou Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Spirochaetes como os filos mais abundantes em camundongos infectados com ZIKV e NI (Figura 9A). No grupo infectado com ZIKV, a abundância de Actinobacteria diminuiu significativamente de 1,8% para 0,3%, (Figura 9B), assim como o filo Firmicutes diminuiu significativamente de 41,8% para 18,2% (Figura 9C) em relação ao grupo controle NI. Em contraste, a infecção por ZIKV aumentou a abundância relativa de Deferribacteres de não detectado para 0,5% (Figura 9F) e Spirochaetes de 4,2% para 42,9% (Figura 9G) quando comparados com camundongos NI. As abundâncias relativas de Bacteroidetes (Figura 9E) e Proteobacteria (Figura 9D) não foram moduladas significativamente pela infecção por ZIKV. Assim, a infecção pelo ZIKV desencadeou uma mudança significativa na composição da comunidade bacteriana nos camundongos imunocompetentes no nível do filo.



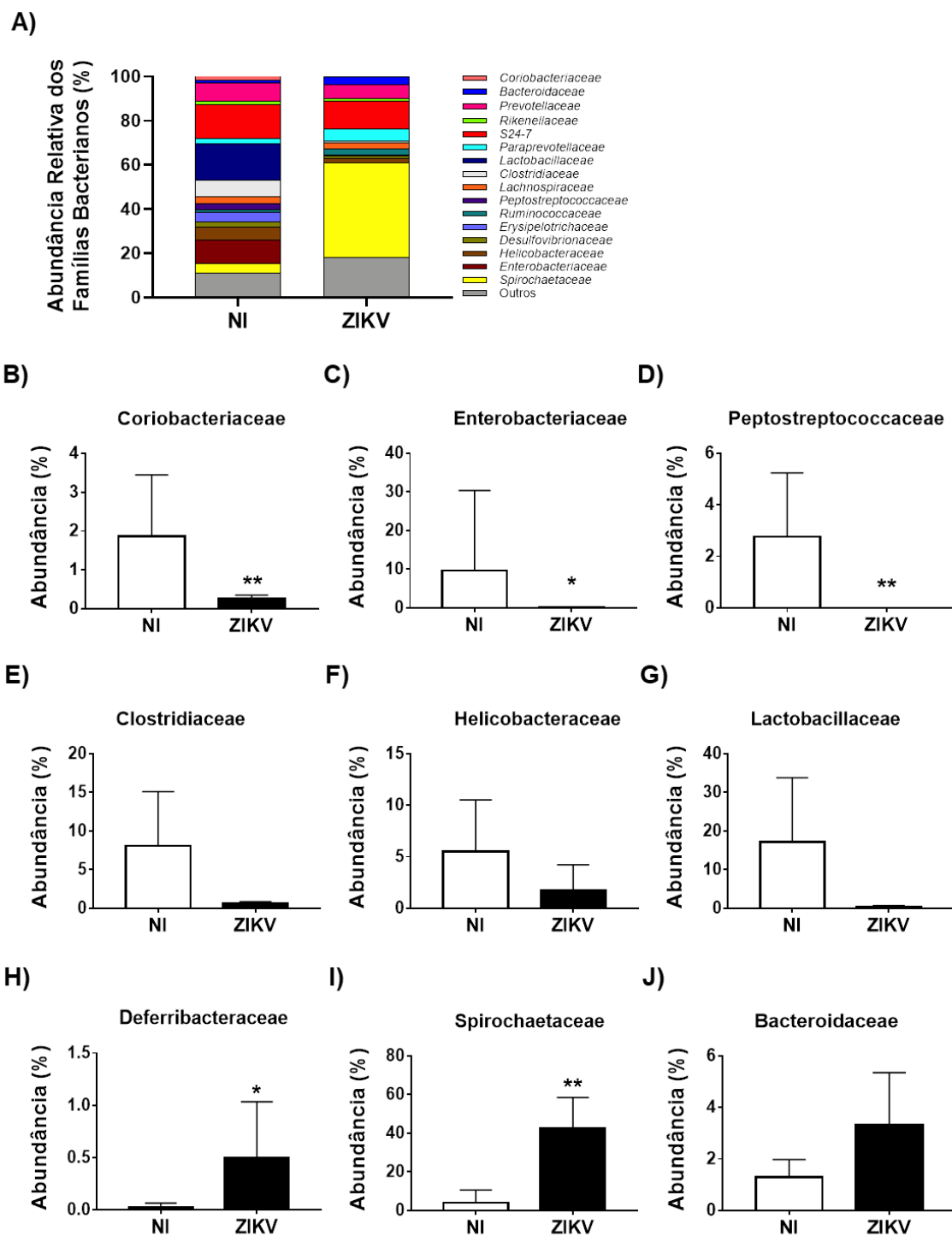
**Figura 9 - Análise da diversidade de filios bacterianos da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes.** Camundongos C57BL/6J (WT) de oito semanas foram infectados i.v com  $10^5$  PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. As fezes foram coletadas e enviadas para a análise da microbiota intestinal. Os gráficos de barras representam a abundância relativa de: (A) Filos, (B) Actinobacteria, (C) Firmicutes, (D) Proteobacteria, (E) Bacteroidetes, (F) Deferribacteres e (G) Spirochaetes. Análise realizada com o N = 5 para cada condição. As análises estatísticas foram realizadas usando um teste t de Student de duas amostras, os valores de p não paramétricos foram calculados com o teste de Mann Whitney, as barras representam um intervalo de confiança de 95% (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### **5.3. A infecção pelo ZIKV aumentou a abundância das famílias Deferribacteraceae e Spirochaetaceae na microbiota intestinal de camundongos selvagens imunocompetentes**

As famílias bacterianas foram escolhidas como próximo nível taxonômico a ser analisado, em que observamos uma modulação causada pela infecção por ZIKV na microbiota intestinal de camundongos imunocompetentes (Figura 10A).

Os níveis de Coriobacteriaceae, uma família do filo Actinobacteria, diminuíram significativamente para 0,3% após a infecção por ZIKV em comparação com o grupo não infectado 1,8% (Figura 10B). Da mesma forma, a família Enterobacteriaceae, dentro do filo Proteobacteria, diminuiu significativamente em abundância aproximadamente cem vezes em camundongos infectados com ZIKV 0,1% quando comparados aos não infectados 10,6% (Figura 10C). A família Peptostreptococcaceae também diminuiu sua abundância nos camundongos infectados com ZIKV 0% (indetectável) em comparação com o grupo NI 2,6% (Figura 10D). A família Helicobacteraceae, também dentro do filo Proteobacteria (Figura 10F) e outras famílias dentro do filo Firmicutes, como Clostridiaceae (Figura 10E) e Lactobacillaceae (Figura 10G), parecem ter sua abundância impactada negativamente no grupo infectado por ZIKV. No entanto, nenhuma diferença significativa em relação aos controles não infectados foi encontrada.

Em contraste, as Deferribacteraceae, uma família dentro do filo Deferribacteres, aumentou no grupo infectado com ZIKV 0,5% em comparação com o grupo de controle NI 0% (indetectável) (Figura 10H). Curiosamente, o impacto mais drástico da infecção por ZIKV na microbiota intestinal de camundongos imunocompetentes testados foi nos componentes de Spirochaetaceae, uma família do filo Spirochaetes, que aumentou cerca de dez vezes, 42,9%, em relação ao grupo de controle NI 4,2% (Figura 10I). Nossos dados não mostraram qualquer modulação significativa da família Bacteroidaceae na microbiota intestinal do grupo de camundongos infectados com ZIKV (Figura 10J). Outras famílias foram analisadas, mas não foram moduladas significativamente pela infecção pelo ZIKV (Tabela 3).



**Figura 10 - Análise da diversidade de filós bacterianos da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes.** Camundongos C57BL/6J (WT) de oito semanas foram infectados i.v com  $10^5$  PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. As fezes foram coletadas e enviadas para a análise da microbiota intestinal. Os gráficos de barras representam a abundância relativa de: (A) Família, (B) Coriobacteriaceae, (C) Enterobacteriaceae, (D) Peptostreptococcaceae, (E) Clostridiaceae, (F) Helicobacteraceae, (G) Lactobacillaceae, (H) Deferribacteraceae, (I) Spirochaetaceae, (K) Bacteroidaceae. Análise realizada com o N = 5 para cada condição. As análises estatísticas foram realizadas usando um teste t de Student de duas amostras, os valores de p não paramétricos foram calculados com o teste de Mann Whitney, as barras representam um intervalo de confiança de 95% (\* p <0,05; \*\* p <0,01).

**Tabela 3 - Modulação da abundância das famílias bacterianas desencadeada pela infecção pelo ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes**

Taxinomia	Total	NI	ZIKV
Unassigned;Other;Other;Other;Other	0.2%	0.1%	0.3%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteria;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae	1.0%	1.8%	0.3%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__	0.1%	0.1%	0.1%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae	2.3%	1.3%	3.3%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae	0.3%	0.2%	0.3%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae	7.3%	8.0%	6.6%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae	1.4%	1.7%	1.1%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7	14.1%	15.5%	12.7%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Odoibacteraceae]	0.2%	0.3%	0.1%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae]	3.7%	2.2%	5.1%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__4C0d-2;o__YS2;f__	0.2%	0.0%	0.3%
k__Bacteria;p__Deferribacteres;c__Deferribacteres;o__Deferribacterales;f__Deferribacteraceae	0.3%	0.0%	0.5%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae	8.4%	16.4%	0.4%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Streptococcaceae	0.1%	0.1%	0.0%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__	8.5%	5.7%	11.2%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae	4.1%	7.6%	0.6%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Dehalobacteriaceae	0.3%	0.3%	0.2%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae	2.9%	3.0%	2.9%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Peptostreptococcaceae	1.3%	2.6%	0.0%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae	1.9%	1.3%	2.4%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae	2.5%	4.6%	0.5%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__RF32;f__	0.0%	0.0%	0.1%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rickettsiales;f__	3.1%	2.6%	3.7%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;Other	0.1%	0.1%	0.1%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Alcaligenaceae	0.9%	0.9%	0.8%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae	1.9%	2.4%	1.4%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae	3.7%	5.8%	1.7%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae	5.3%	10.6%	0.1%
k__Bacteria;p__Spirochaetes;c__Spirochaetes;o__Spirochaetales;f__Spirochaetaceae	23.5%	4.2%	42.9%
k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__Mycoplasmatales;f__Mycoplasmataceae	0.1%	0.1%	0.2%
k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__RF39;f__	0.1%	0.1%	0.1%

#### **5.4. A modulação da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV leva a um recrutamento de leucócitos para o cólon dos camundongos selvagens imunocompetentes**

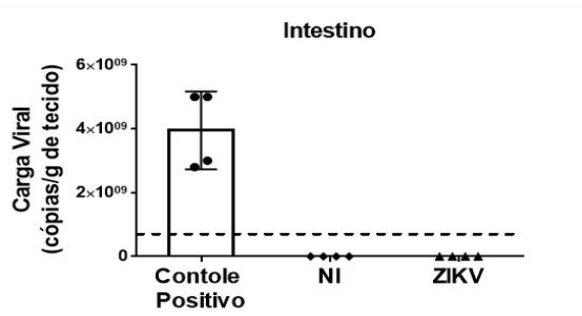
Ao verificarmos que a infecção pelo ZIKV modula a microbiota intestinal nos camundongos selvagens imunocompetentes, nos perguntamos se o ZIKV poderia ainda estar presente neste tecido. Para responder a esta questão, realizamos a extração de RNA do tecido do cólon e realizamos rt-PCR para a detecção do material genético viral. Entretanto, não observamos a presença de ZIKV no cólon 14 dias após a infecção (Figura 11A).

Além disso, fomos investigar se a modulação da microbiota induzida pela infecção por ZIKV foi capaz de induzir inflamação local no intestino desses camundongos. Para isso, coletamos partes do cólon dos camundongos, extraímos as proteínas e detectamos a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon. Entretanto, nenhuma diferença significativa no nível de produção das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-33 foi detectado no cólon, quando comparamos os grupos ZIKV e NI (Figura 11B).

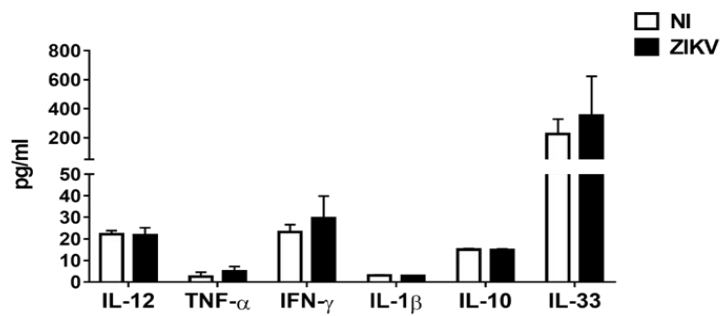
Embora a infecção pelo ZIKV e a modulação da microbiota intestinal não tenham induzido nenhuma modificação significativa na produção de citocinas no cólon, detectamos que a modulação da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV desencadeou uma infiltração leucocitária e dano ao epitélio intestinal (Figura 11C) em camundongos do grupo ZIKV, quando comparado aos camundongos do grupo NI. As seções do cólon coradas com HE exibiram uma infiltração moderada de células inflamatórias que pode ser vista na mucosa e submucosa do cólon intestinal e mudanças epiteliais leves, como perda de células caliciformes, hiperplasia e perda de erosão no epitélio superficial em camundongos que foram infectados com ZIKV (Figura 11C c - f) em comparação com camundongos NI (Figura 11C a - b).



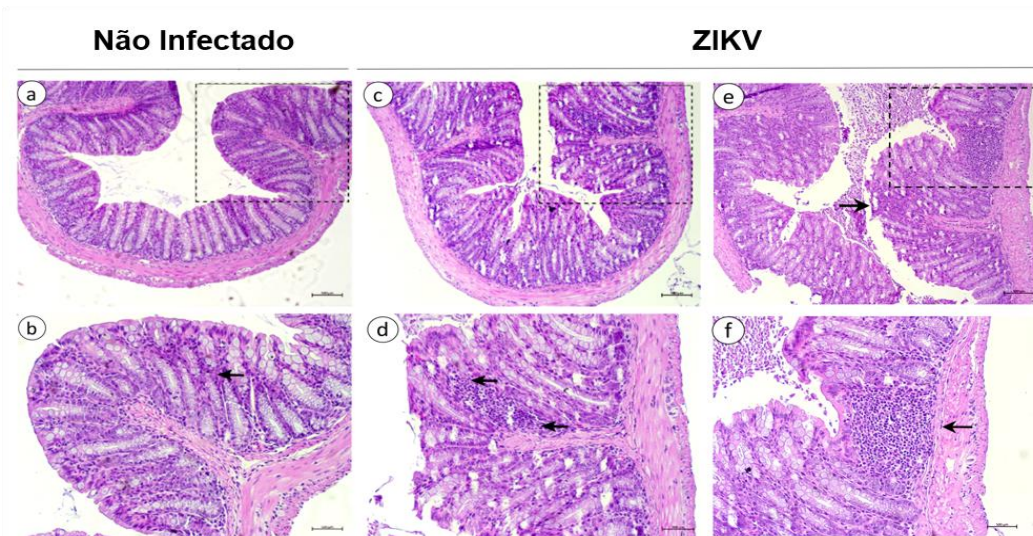
A)



B)



C)

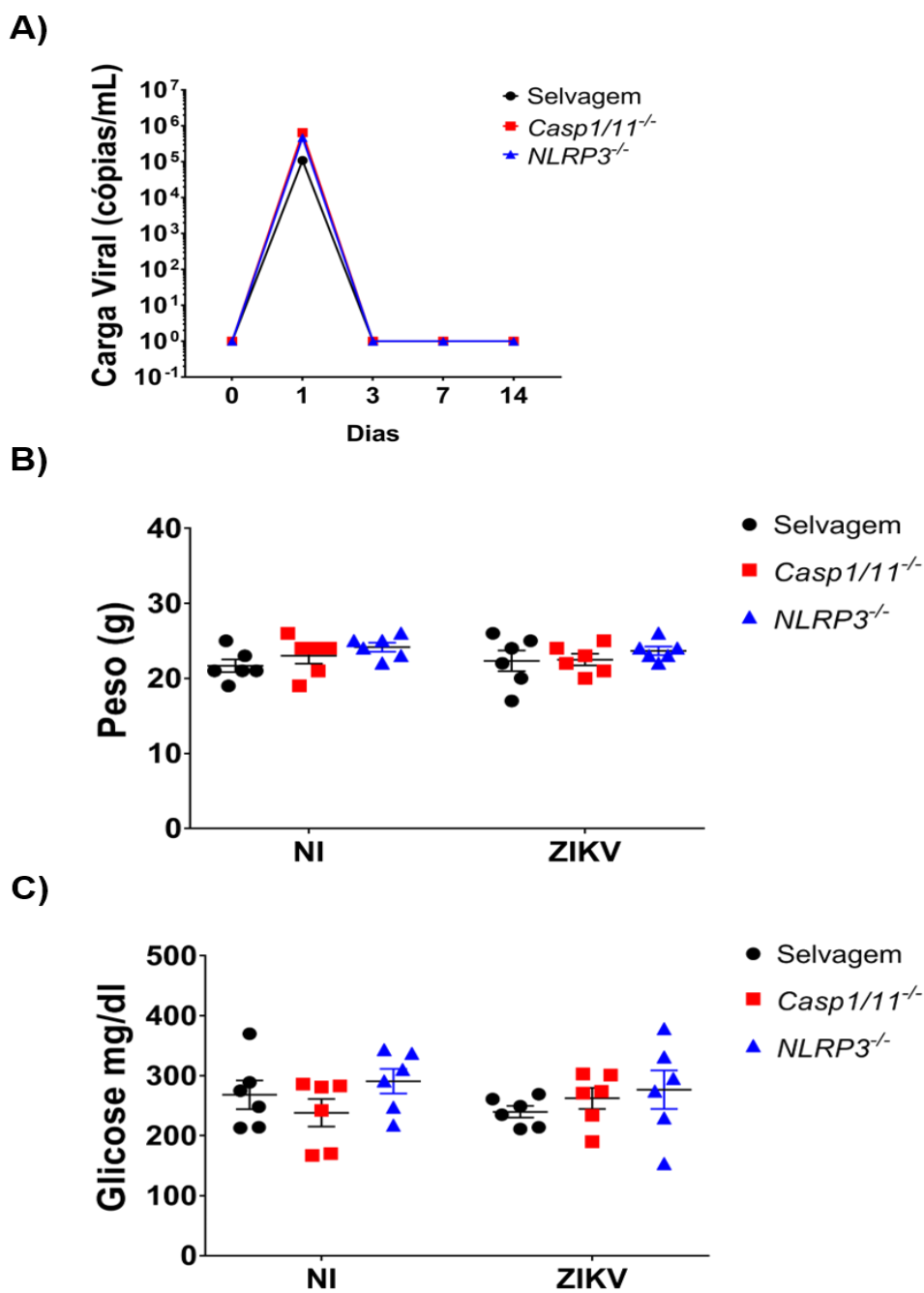


**Figura 11 - A modulação da microbiota intestinal induzida pela infecção por ZIKV causa dano ao epitélio intestinal e recrutamento de leucócitos para a lâmina própria de camundongos selvagens imunocompetentes.** Camundongos C57BL/6J (WT) de oito semanas foram infectados i.v com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. Os cólons intestinais foram coletados, foram extraídas proteínas e RNA viral. (A) O título viral foi avaliado por rt-PCR. (B) Os níveis das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-33 foram quantificados pela técnica de ELISA. A morfologia histológica do cólon foi analisada por coloração HE e adquirida em microscópio Zeiss (C). Ca-b representa seção de camundongos não infectados e Cc-f representa seções de camundongos infectados com ZIKV. Cb, Cd e Cf apresentam área ampliada de Ca, Cc e Ce, respectivamente. A infiltração de leucócitos e o epitélio danificado são indicados por setas pretas. Análise realizada com o N = 5 para cada condição. As análises estatísticas foram realizadas usando um teste t de duas amostras de Student, os valores p não paramétricos foram calculados com o teste de Mann Whitney. As barras gráficas representam um intervalo de confiança de 95% (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### **5.5. A infecção por ZIKV não alterou o peso e a glicemia de camundongos selvagens imunocompetentes, independente da presença de NLRP3 e Caspases-1/11**

Sabe-se que o ZIKV ativa o inflamassoma NLRP3 e induz a secreção de IL-1 $\beta$  e a inflamação *in vitro* e em camundongos imunocomprometidos (He et al., 2018; Wang et al., 2018). Entretanto, em modelos murinos em que as proteínas do inflamassoma NLRP3 e as proteínas Caspases-1/11 estão ausentes, ainda não se sabe o efeito que a infecção por ZIKV pode causar nesses modelos. Portanto, infectamos camundongos selvagens imunocompetentes (C57BL/6J) e nocautes para as proteínas Caspases-1/11 (Casp1/11<sup>-/-</sup>) e NLRP3 (NLRP3<sup>-/-</sup>) com oito semanas de idade e avaliamos a sobrevivência por 28 dias após a infecção (dpi) e nenhum camundongo veio a óbito nesse período. Ao analisarmos a carga viral durante 14 dpi, observamos que, assim como os camundongos selvagens, os camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> zeraram a carga viral já no terceiro dia de infecção (Figura 12A).

Ao avaliarmos se a infecção por ZIKV induz alteração no peso dos camundongos selvagens após 14 dias de infecção, nossos resultados não mostraram alterações significativas no peso desses camundongos, independente da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 (Figura 12B). Em seguida, analisamos se a infecção por ZIKV induz a alteração na glicemia dos camundongos selvagens, e observamos também que a infecção por ZIKV não modifica a glicemia dos camundongos em jejum, independente da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 (Figura 12C).



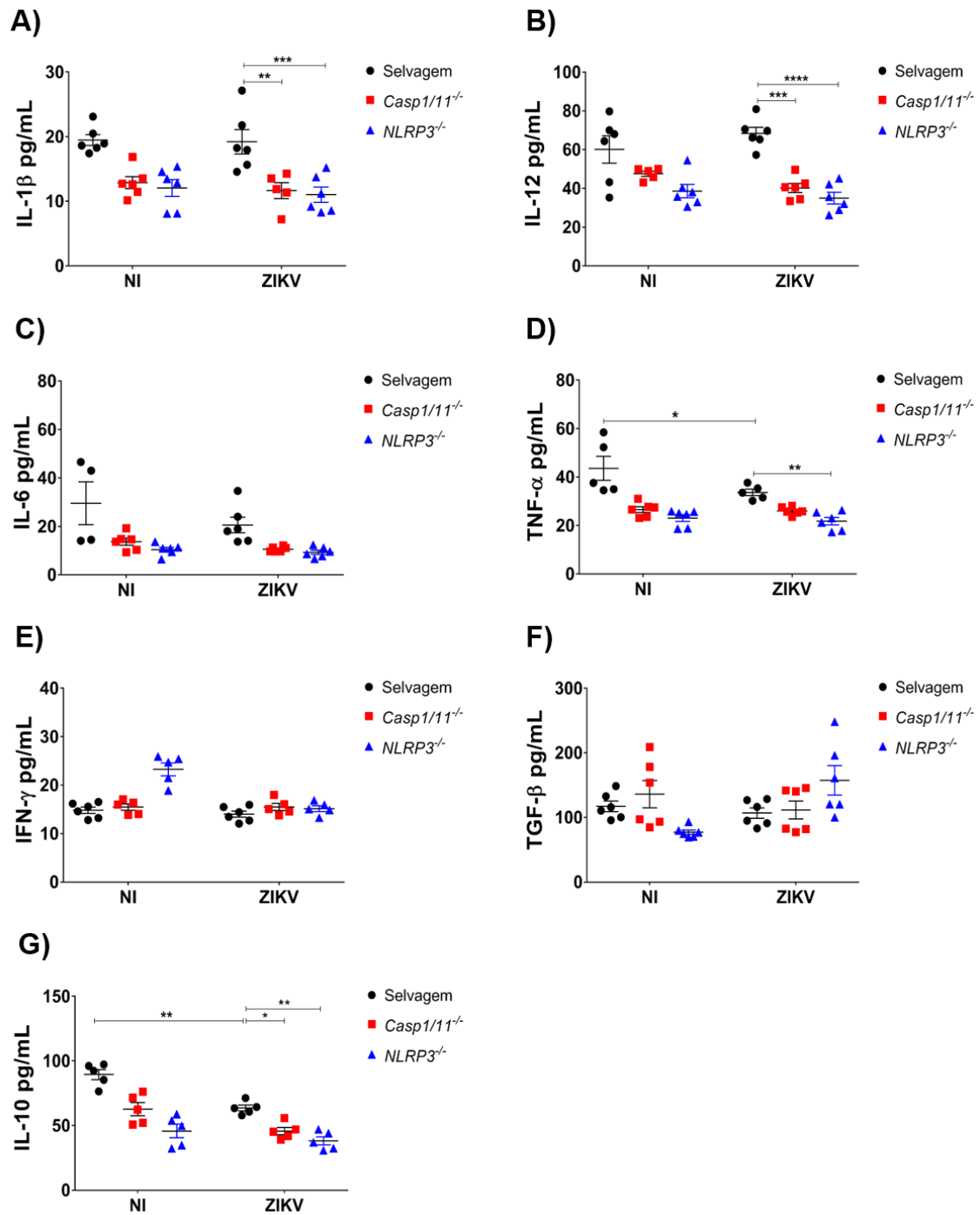
**Figura 12 - A infecção por ZIKV não altera a carga viral, peso e glicemia em camundongos selvagens, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>*.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e *NLRP3<sup>-/-</sup>* de oito semanas foram infectados intraperitonealmente (i.p) com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. O sangue foi coletado nos dias 1, 3, 7 e 14 após a infecção e no dia 0. O RNA viral foi extraído e a rt-PCR foi realizada para determinar a carga viral presente no soro desses camundongos (A). No final do 14º dia pós infecção (dpi), após realização do jejum, anestesiámos os camundongos, pesamos em balança (B) e dosamos a glicose presente no sangue com o auxílio de um medidor de glicose (C). Os experimentos foram realizados duas vezes com um N=6 animais por grupo. A estatística foi realizada usando o teste 2 way-ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05.

## **5.6. A infecção por ZIKV induziu uma diminuição da presença de TNF- $\alpha$ e IL-10 no soro dos camundongos selvagens e nocautes para a proteína NLRP3**

Ao analisarmos o perfil de citocinas séricas após a infecção por ZIKV nos camundongos, observamos que o ZIKV não modulou a secreção de IL-1 $\beta$  (Figura 13A) e IL-12 (Figura 13B) nos camundongos selvagens quando comparados com seus grupos controles NI, porém, quando comparamos os grupos ZIKV selvagem com os grupos ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup> e ZIKV NLRP3<sup>-/-</sup> observamos uma diminuição significativa na secreção de IL-1 $\beta$  e IL-12.

Entretanto, quando analisamos a secreção da citocina IL-6 não observamos diferenças significativas entre os camundongos selvagens e nocautes infectados quando comparados aos camundongos não infectados (Figura 13C). Já os níveis da citocina TNF- $\alpha$  (Figura 13D) no soro dos camundongos, vimos que o ZIKV induz uma diminuição significativa dessa citocina, quando comparados com os grupos NI nos camundongos selvagens. Além disso, essa diminuição de TNF- $\alpha$  induzida pelo ZIKV é ainda mais intensa na ausência da proteína NLRP3 (Figura 13D).

Ao avaliarmos a secreção das citocinas IFN- $\gamma$  (Figura 13E) e TGF- $\beta$  (Figura 13F) não observamos alterações significativas mediadas pela infecção por ZIKV nos camundongos imunocompetentes, nem quando comparamos aos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>. Já a citocina IL-10, houve uma diminuição significativa da secreção desta citocina no soro dos camundongos selvagens infectados por ZIKV, e essa diminuição foi ainda mais intensa nos camundongos nocautes para as proteínas Caspases-1/11 e NLRP3 (Figura 13G).

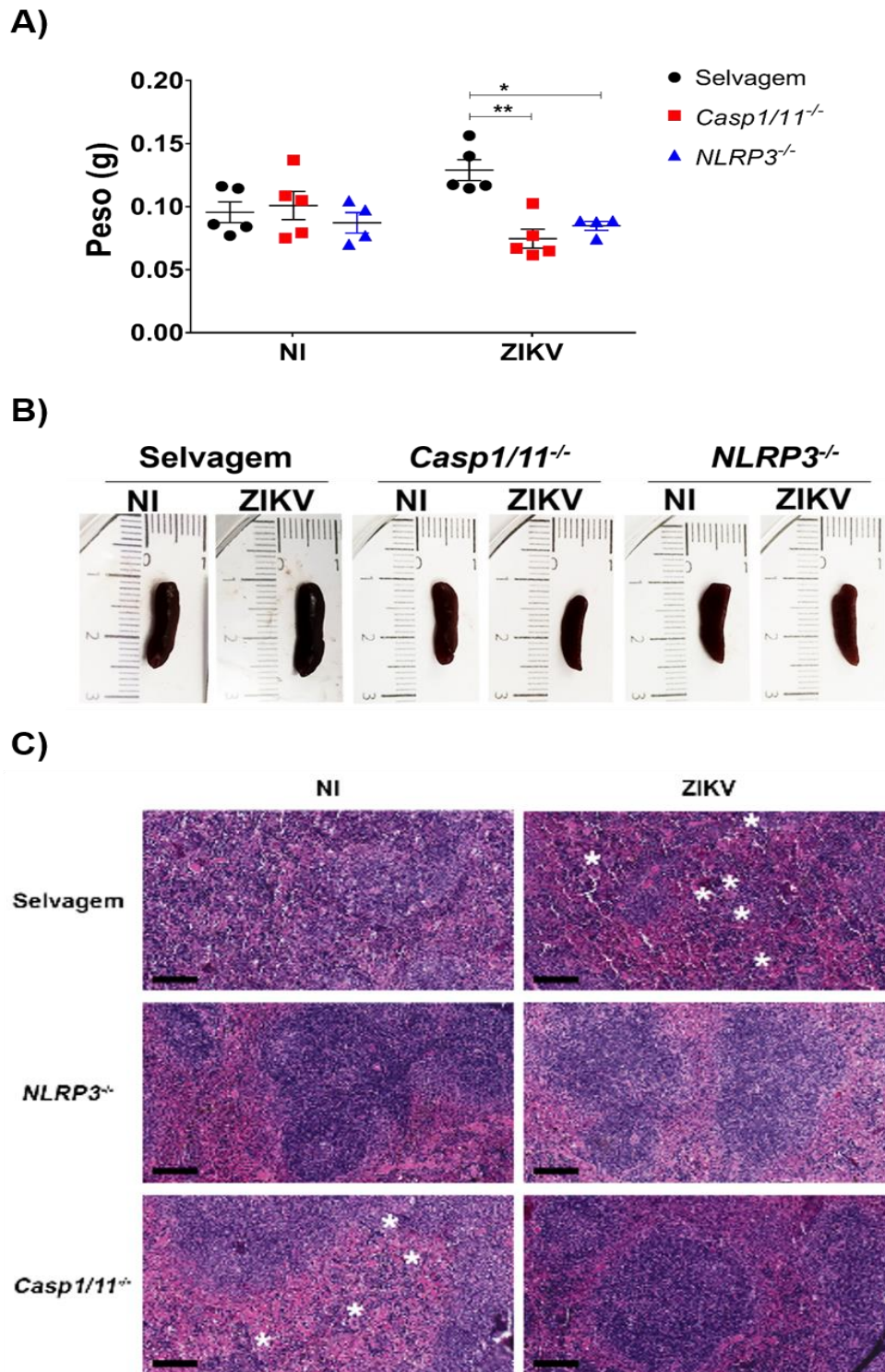


**Figura 13 - Análise de citocinas séricas em camundongos selvagens *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>* após a infecção por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e *NLRP3<sup>-/-</sup>* de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. O sangue foi coletado 14 dpi. O Soro foi extraído por centrifugação e os níveis das seguintes citocinas foram dosados por ELISA (A) IL-1β, (B) IL-12, (C) IL-6, (D) TNF-α, (E) IFN-γ, (F) TGF-β e (G) IL-10. Os experimentos foram realizados duas vezes com um N=6 animais por grupo. Os valores atípicos (outlier) foram retirados com o auxílio da calculadora de outlier do GraphPad Prisma. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05. As diferenças estatísticas entre os grupos foram representados por asteriscos em que \* p>0,05, \*\* p>0,01, \*\*\* p>0,001 e \*\*\*\* p>0,0001.

### **5.7. Não foi detectado aumento de tamanho e peso do baço em camundongos selvagens e nocautes após a infecção por ZIKV**

Analisamos se a infecção por ZIKV estaria induzindo uma esplenomegalia, que consiste em aumento do volume do baço. Para isso, após 14 dias de infecção e a eutanásia dos animais, coletamos, pesamos e fotografamos o baço de cada animal. Embora, tivéssemos um leve aumento no peso dos baços dos camundongos selvagens infectados com ZIKV, esse aumento não foi significativo quando comparado com o grupo NI (Figura 14A). Porém, quando comparamos os baços dos camundongos selvagens infectados com ZIKV e os baços dos camundongos nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 infectados por ZIKV, observamos uma diminuição significativa de peso (Figura 14A) e tamanho (Figura 14B) dos baços infectados nos camundongos nocautes quando comparados aos baços dos camundongos selvagens infectados com ZIKV.

Ao analisar os baços dos camundongos por histologia, verificamos a expansão da polpa vermelha e organização da polpa branca em folículos linfoides marcados nos grupos infectados por ZIKV, quando comparados com os grupos NI (Figura 14C). Em camundongos infectados e/ou nocauteados, há ocorrência de hiperplasia nodular e linfocitária, com agregação extensa de linfócitos, e aumento na quantidade e tamanho dos elementos da polpa branca, como bainhas linfoides periarteriolares (PALS) e folículos. Hiperplasia nodular compreende a proliferação de componentes da polpa branca, enquanto a hiperplasia de linfócitos é descrita como um aumento na celularidade dos linfócitos. É esperado um aumento do número de linfócitos normais maduros em resposta à infecção por ZIKV. Em todos os grupos há manutenção da arquitetura esplênica (compartimentos da polpa branca e polpa vermelha), mesmo naqueles apresentando hiperplasia linfocitária.



**Figura 14 - A** infecção por ZIKV não induziu esplenomegalia no baço de camundongos selvagens, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>*. Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e *NLRP3<sup>-/-</sup>* de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. O baço foi coletado, pesado em balança e fotografado com câmera de celular. (A) O gráfico de barras contém um N=4-6. (B) E a foto é representativa de um único animal de cada grupo. (C) Histologia representativa do Baço dos camundongos marcados com coloração de hematoxilina e eosina. Barra de escala: 100µm, os macrófagos são indicados com um \*branco. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de  $p > 0,05$ . As diferenças estatísticas entre os grupos foram representados por asteriscos onde \*  $p > 0,05$  e \*\*  $p > 0,01$ .

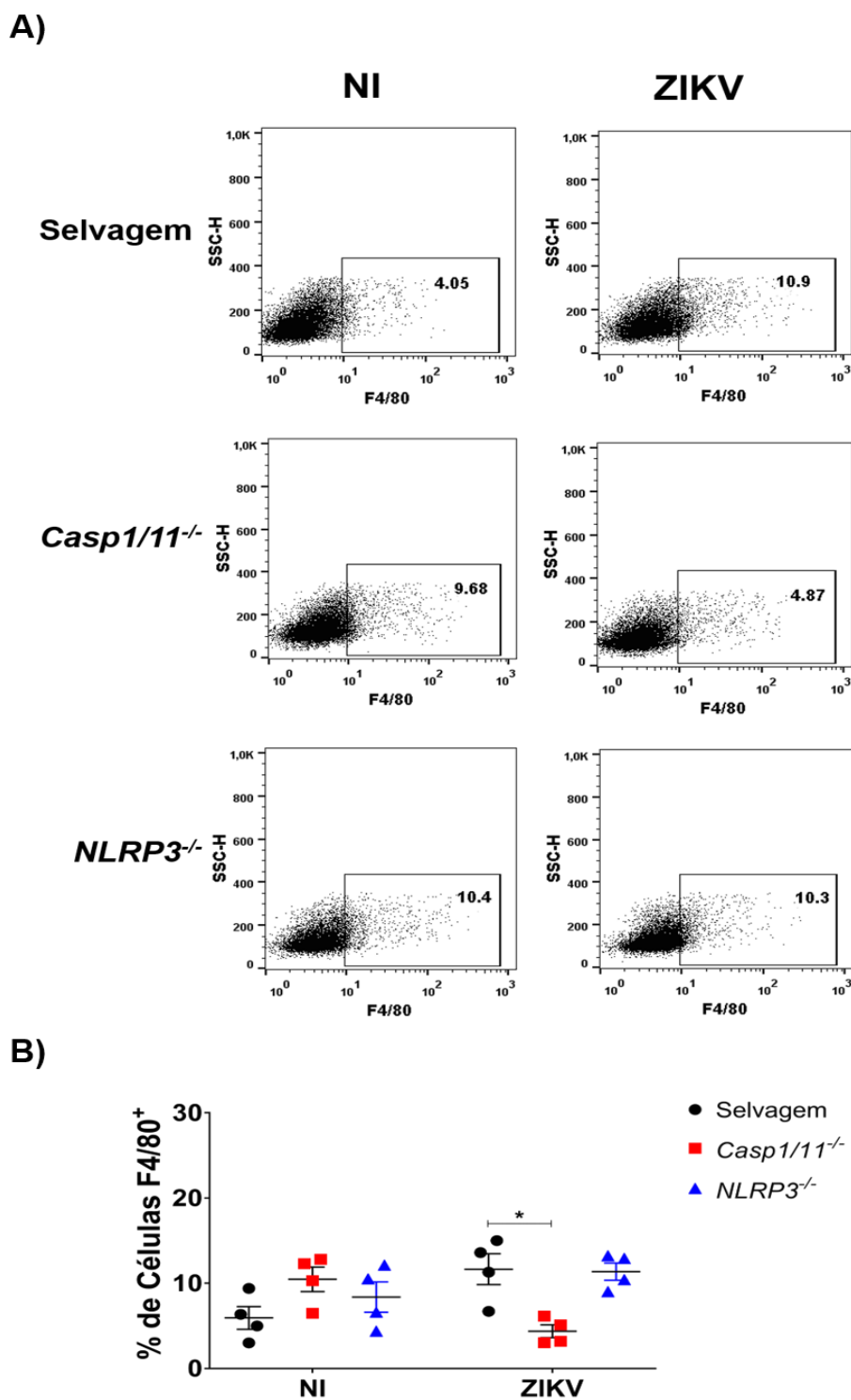
## 5.8. Não foi detectado aumento da presença de macrófagos no baço de camundongos selvagens e nocautes após a infecção por ZIKV

Estudos *in vitro* mostraram que o ZIKV é capaz de infectar e se reproduzir em macrófagos derivados de monócitos e macrófagos placentários humanos e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Quicke et al., 2016; Magoro et al., 2019; Österlund et al., 2019), entretanto, o papel dos macrófagos em infecções de modelo murino ainda não está claro. Portanto, avaliamos se o ZIKV modularia o recrutamento de macrófagos no baço de camundongos selvagens imunocompetentes após a infecção e o papel da ausência das proteínas Caspases-1/11 e NLRP3.

Ao analisar a porcentagem de células F4/80+ (Marcador de Macrófagos) nos histogramas representativos (Figura 15A), observamos um aumento na porcentagem de células F4/80+ no baço de camundongos selvagens infectados por ZIKV, quando comparados com os baços de camundongos selvagens NI. Porém, nos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> foi observado o efeito oposto aos camundongos selvagens, ou seja, uma diminuição de células F4/80+ no grupo ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup> quando comparado ao grupo NI Casp1/11<sup>-/-</sup>. Enquanto, observamos que os camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> não apresentaram diferenças na porcentagem de células F4/80+ quando comparamos os grupos NI e ZIKV (Figura 15A).

Entretanto, quando avaliamos o papel da ausência das proteínas caspases1/11 no recrutamento de macrófagos para o baço induzido pela infecção por ZIKV, verificamos uma diminuição significativa no grupo ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup> quando comparado ao grupo ZIKV selvagem (Figura 15B). Em suma, assim como vimos a presença de macrófagos na histologia do baço (Figura 14C), confirmamos que o ZIKV, mesmo 14 dpi, induz uma diminuição no recrutamento de macrófagos no baço de camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup>.





**Figura 15 - Análise da presença de macrófagos no baço de camundongos selvagens, Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (Casp1/11<sup>-/-</sup>) e NLRP3<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com anticorpo anti-F4/80-FITC e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05. As diferenças estatísticas entre os grupos foram representados por asteriscos em que \* p>0,05.

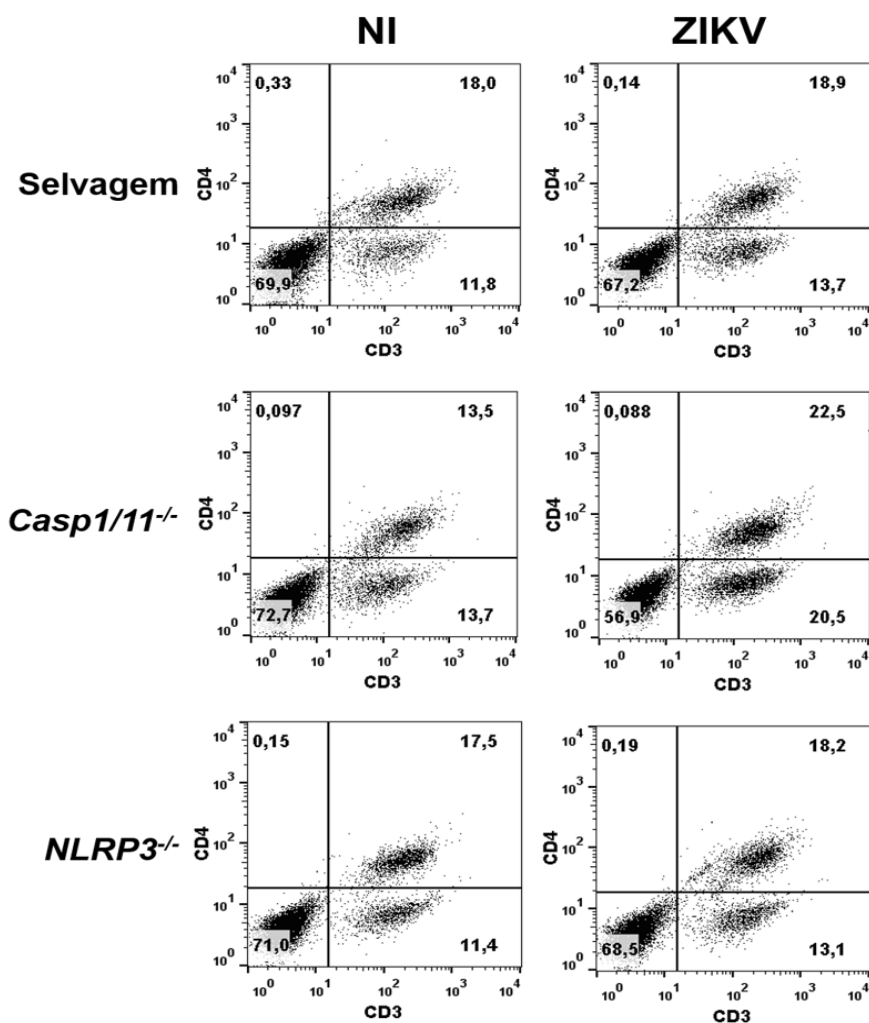
### **5.9. A infecção por ZIKV não induziu aumento da presença de linfócitos T CD4+ no baço de camundongos selvagens imunocompetentes e nem nos camundongos nocautes**

Vários estudos demonstraram uma resposta de células T de curta duração, mas forte, cerca de sete dias após a infecção em camundongos selvagens imunocompetentes infectados com ZIKV (Huang et al., 2017; Pardy et al., 2017; Winkler et al., 2017). Sendo assim, fomos analisar se o ZIKV induz o recrutamento de células T para o Baço, mesmo após 14 dias de infecção e o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11.

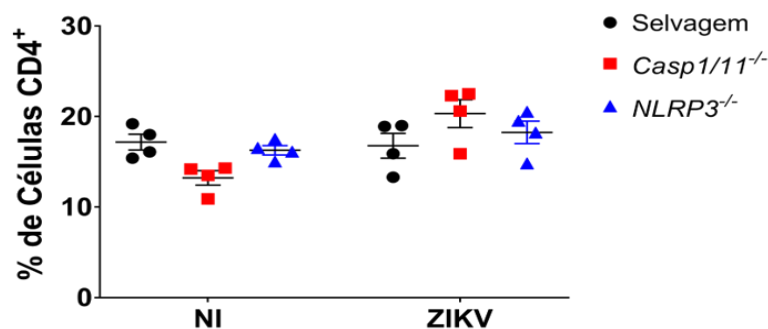
Ao analisarmos a porcentagem de células CD3+ e CD4+ (Marcadores de linfócitos T CD4) no quadrante dos histogramas representativos (Figura 16A); temos em camundongos selvagens não infectados 18% de células CD3+CD4+ contra 18,9% do grupo infectado com ZIKV. Já nos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> temos 22,5% no grupo ZIKV contra 13,5% no grupo não infectado de células CD3+CD4+. Enquanto nos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> temos 17,5% de células CD3+CD4+ no grupo não infectado contra 18,2% do grupo infectado com ZIKV.

Entretanto, quando fomos analisar se ausência das proteínas NLRP3 e Caspases1/11 modulam a presença de linfócitos T CD4 no baço após a infecção por ZIKV, não observamos diferenças significativas entre os grupos ZIKV selvagem, ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup> e ZIKV NLRP3<sup>-/-</sup> (Figura 16B).

A)



B)



**Figura 16 - Análise da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no baço de camundongos selvagens, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> e *NLRP3*<sup>-/-</sup> infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11*<sup>-/-</sup>) e *NLRP3*<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com anticorpos anti-CD3-FITC e anti-CD4-PE e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05.

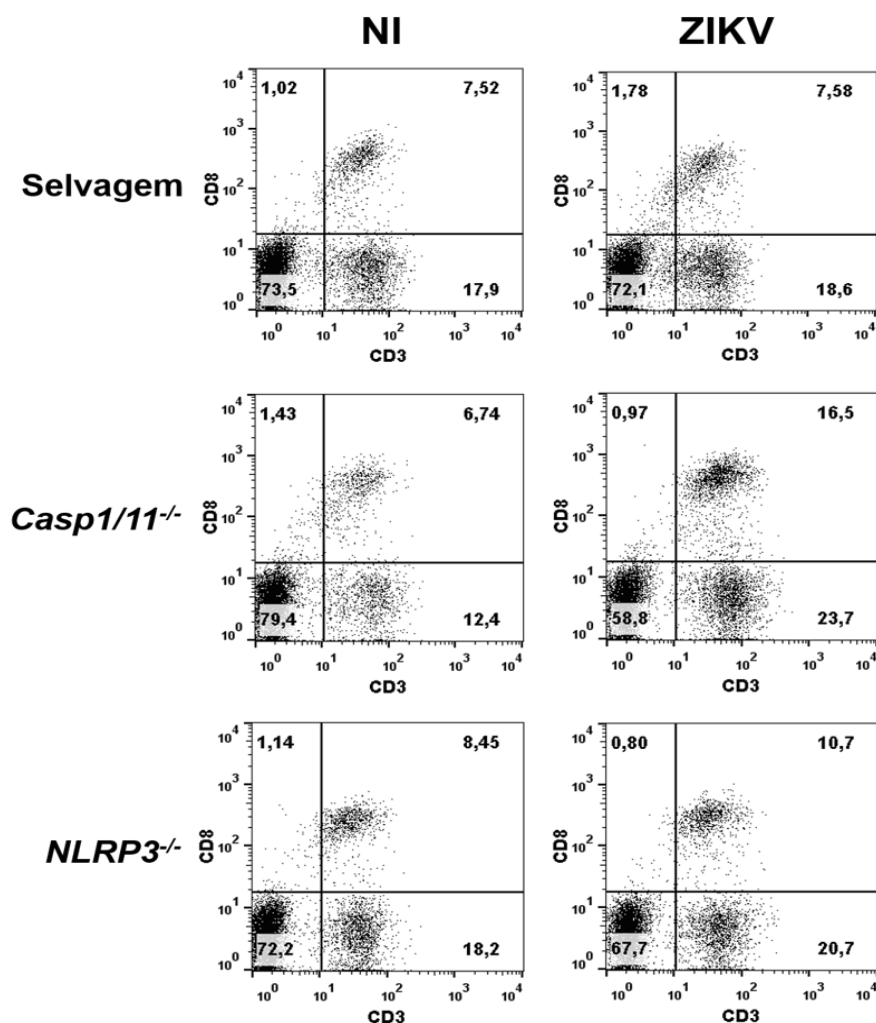
#### **5.10. A infecção por ZIKV não induziu aumento da presença de linfócitos T CD8+ no baço de camundongos selvagens imunocompetentes, mas induziu em animais nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11**

As células T CD8 são importantes componentes da imunidade adaptativa para o controle de infecções virais (Hashimoto et al., 2019). Já se sabe que o ZIKV induz uma resposta efetora via células T CD8 em curto prazo em camundongos selvagens imunocompetentes (Huang et al., 2017). Por isso analisamos se a infecção por ZIKV ainda aumentava a porcentagem de linfócitos TCD8 no baço.

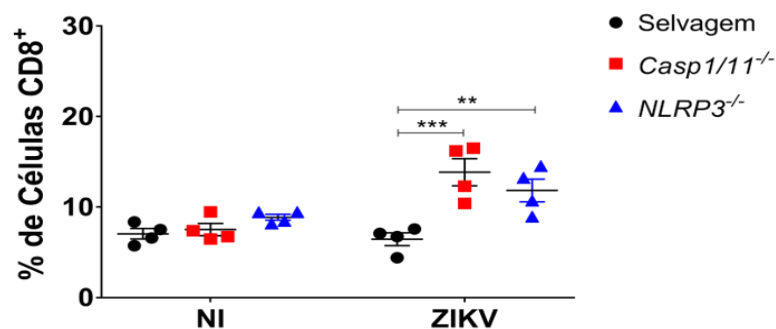
Nos histogramas representativos, encontramos em camundongos selvagens não infectados 7,52% de células CD3+CD8+ contra 7,58% de células CD3+CD8+ do grupo infectado com ZIKV. Já nos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup>, temos 16,5% no grupo ZIKV contra 6,74% no grupo não infectado de células CD3+CD8+. Enquanto nos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> temos 8,45% de células CD3+CD8+ no grupo não infectado contra 10,7% do grupo infectado com ZIKV (Figura 17A).

Entretanto, quando -examinamos se ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 modulam a presença de células CD3+CD8+ no baço após a infecção por ZIKV, observamos um aumento significativo da presença dessas células no baço de camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV, quando comparamos aos camundongos selvagens infectados com ZIKV (Figura 17B).

A)



B)



**Figura 17 - Análise da presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no baço de camundongos selvagens, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> e *NLRP3*<sup>-/-</sup> infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11*<sup>-/-</sup>) e *NLRP3*<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com anticorpos anti-CD3-FITC e anti-CD8-APC e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05. As diferenças estatísticas entre os grupos foram representados por asteriscos em que \* p>0,05, \*\* p>0,01 e \*\*\* p>0,001.

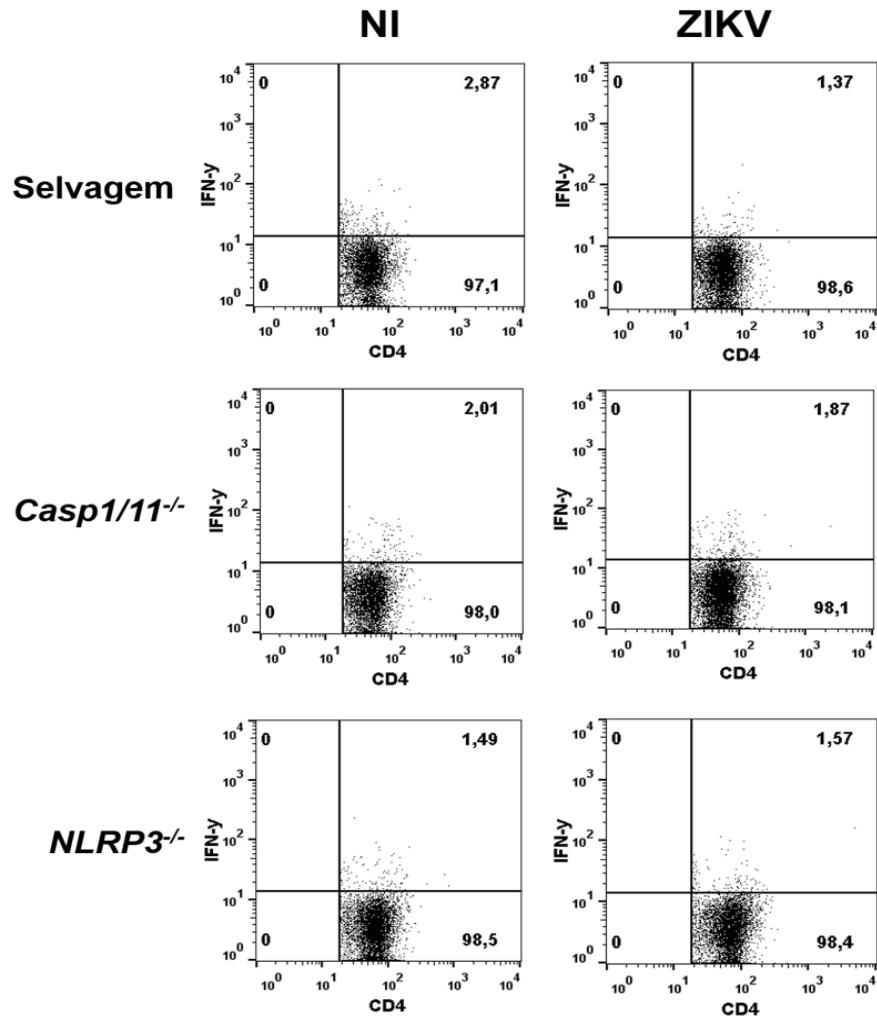
**5.11. A infecção por ZIKV não modulou a presença de linfócitos T CD4+ que secretam IFN- $\gamma$  no baço de camundongos selvagens imunocompetentes e nem nos camundongos nocautes**

A infecção por ZIKV em camundongos imunocompetentes induz uma resposta robusta das células Th1 CD4, que apresenta expressão do fator de transcrição T-bet e produção de citocinas efetoras IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (Pardy et al., 2017). Sendo assim, verificamos se a infecção por ZIKV em camundongos selvagens recruta linfócitos TCD4 que secretam IFN- $\gamma$  para o baço, e o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases1/11 nesse contexto.

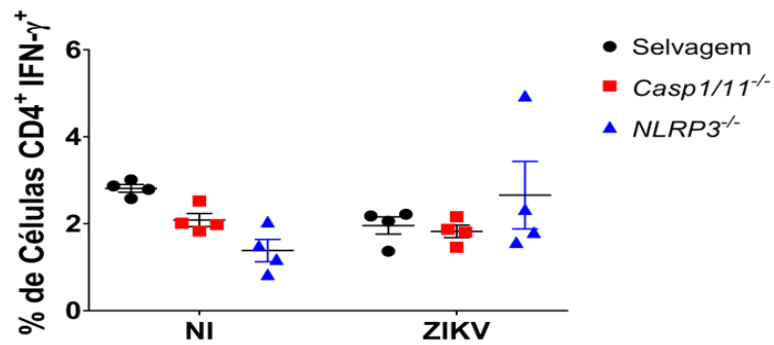
Ao avaliarmos a porcentagem de células CD4+IFN $\gamma$ + no quadrante dos histogramas representativos (Figura 18A), observamos cerca de 2,87% de células positivas no grupo NI e 1,37% de células positivas no grupo ZIKV nos camundongos selvagens. Já nos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup>, foram encontrados 2,01% de células CD4+IFN- $\gamma$ + no grupo NI, enquanto que, no grupo ZIKV, foram encontrados 1,87% de células CD4+IFN- $\gamma$ +. Por fim, nos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> observamos 1,49% de células positivas no grupo NI contra 1,57% de células positivas no grupo ZIKV.

Verificamos que a infecção por ZIKV não induziu uma modulação significativa na porcentagem de linfócitos TCD4+ que secretam IFN- $\gamma$  nos camundongos selvagens e ao analisarmos o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases1/11, também não observamos modulações significativas na presença desses linfócitos no baço durante a infecção por ZIKV nesses camundongos (Figura 18B).

A)



B)



**Figura 18 - Análise da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> no baço de camundongos selvagens, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> e *NLRP3*<sup>-/-</sup> infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11*<sup>-/-</sup>) e *NLRP3*<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com anticorpos anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE e anti-IFN-γ-APC, e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05.

### **5.12. A infecção por ZIKV induziu uma diminuição na expressão de MHC-II em esplenócitos de camundongos selvagens imunocompetentes**

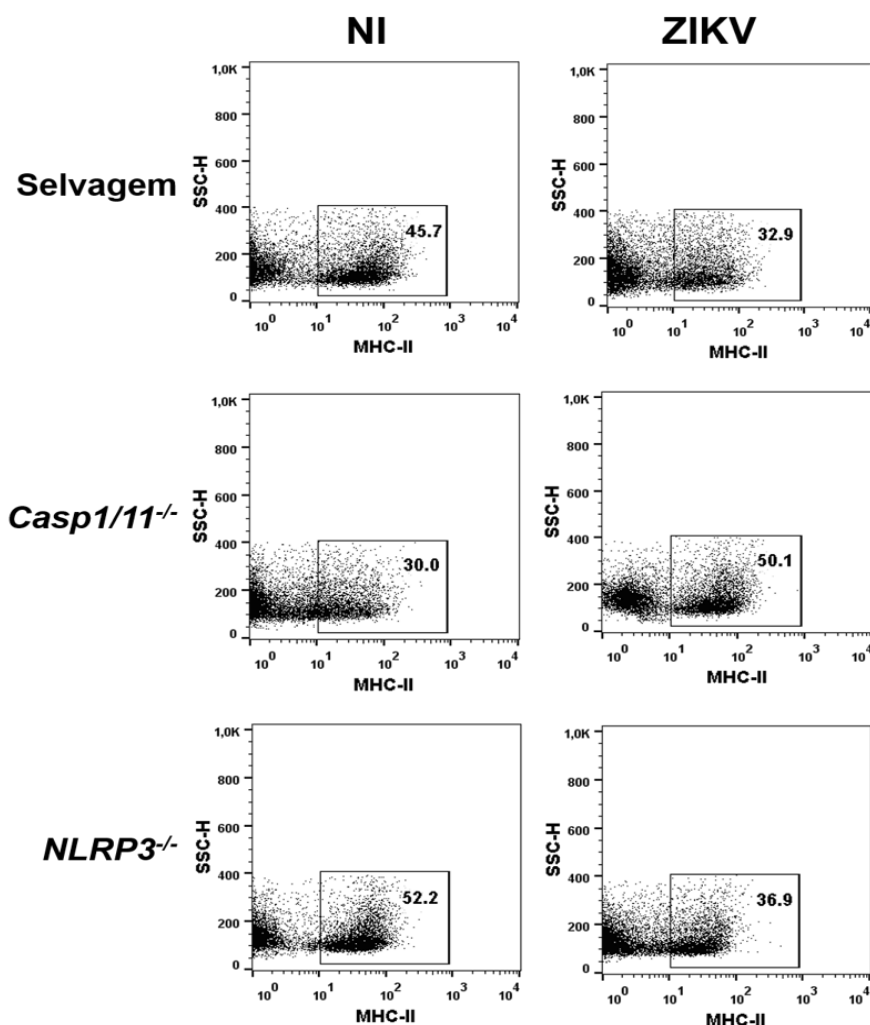
A apresentação clássica de antígenos na resposta imune adaptativa celular ocorre por meio do reconhecimento de peptídeos apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II dos linfócitos T convencionais (Wearsch and Cresswell, 2008; Roche and Furuta, 2015). Sabendo que o ZIKV induz uma resposta de linfócitos TCD4 e TCD8 em tempos iniciais da infecção em camundongos selvagens imunocompetentes, investigamos se a apresentação de antígenos estava sendo modulada, por meio da análise da expressão de MHC-II nos esplenócitos dos camundongos selvagens e nocautes infectados.

Nos histogramas representativos mostrados na Figura 19A, observamos uma diminuição da expressão de MHC-II no grupo infectado por ZIKV (32,9%) quando comparado ao grupo NI (45,7%) dos camundongos selvagens. Ao analisarmos os camundongos nocautes para as caspases1/11, foi observado um efeito oposto aos camundongos selvagens, ou seja, um aumento da expressão de MHC-II nas células do grupo ZIKV (50,1%) quando comparado ao grupo controle NI (30%). Já nos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>, observamos efeito semelhante aos camundongos selvagens. Houve diminuição na expressão de MHC-II nas células do grupo ZIKV (36,9%) quando comparados ao grupo controle NI (52,2%).

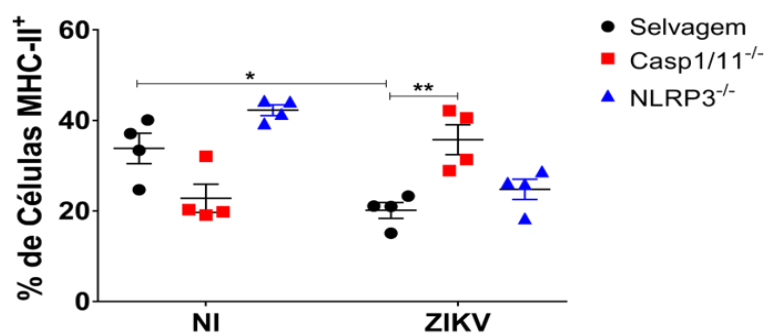
Ao analisarmos o gráfico de barras com um aumento do N amostral, verificamos que a infecção por ZIKV diminui significativamente a expressão de MHC-II nos esplenócitos de camundongos selvagens quando comparados aos camundongos controles (NI), e essa redução não ocorre no baço dos camundongos infectados por ZIKV nocautes para as Caspases-1/11. Já que, na ausência dessas proteínas, a infecção por ZIKV aumenta a expressão de MHC-II nos esplenócitos (Figura 19B).



A)



B)



**Figura 19 - Diminuição da expressão de MHC-II em esplenócitos de camundongos selvagens infectados por ZIKV independente da presença das Caspases1/11.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (Casp1/11<sup>-/-</sup>) e NLRP3<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com anticorpos anti-MHC-II-PE-Cy5, e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05. As diferenças estatísticas entre os grupos foram representados por asteriscos em que \* p>0,05 e \*\* p>0,01.

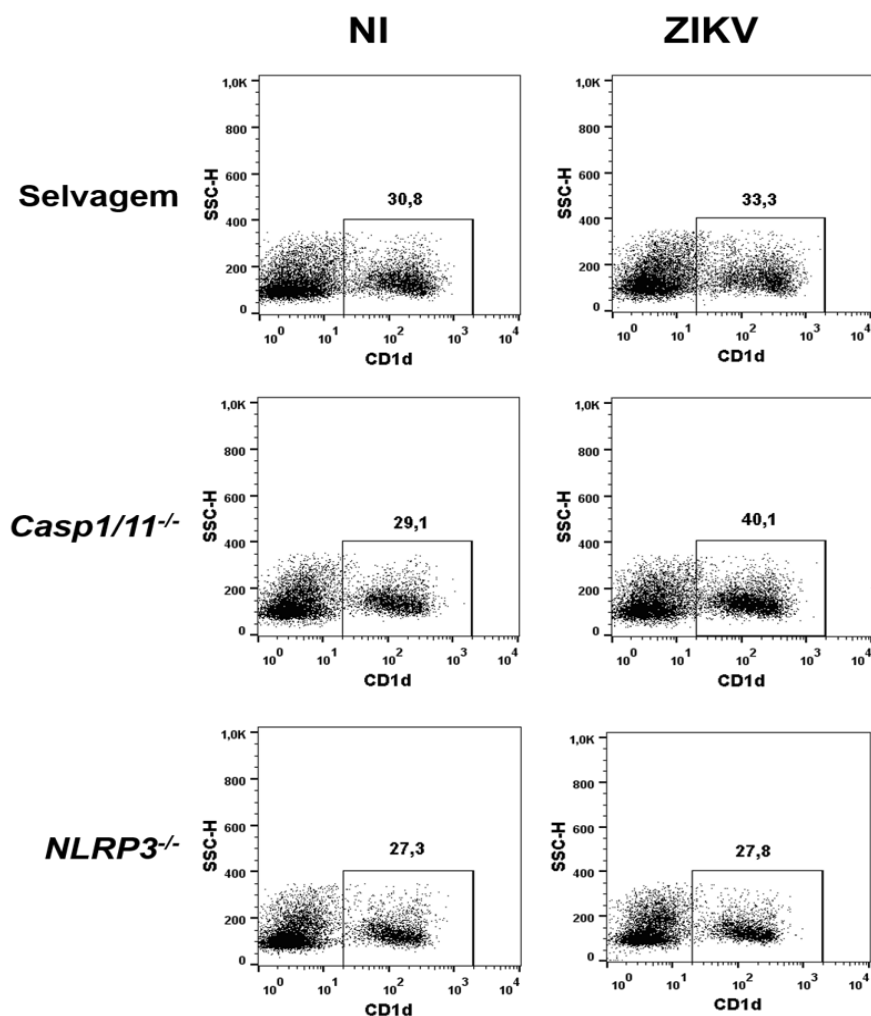
### **5.13. A infecção por ZIKV não modulou a expressão de CD1d em esplenócitos de camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes**

Ao contrário das células T convencionais, que reconhecem antígenos peptídicos apresentados nas moléculas de MHC, as células exterminadoras naturais (NK) reconhecem antígenos lipídicos apresentados pela molécula CD1d (Brutkiewicz et al., 2018). Um membro da família CD1, o CD1d é uma molécula do tipo MHC não polimórfica classe I, expressa em células apresentadoras de antígeno (APCs) (Brigl and Brenner, 2004). Vários vírus, como o dengue, induzem a regulação positiva de CD1d, que se correlaciona com a ativação de células NK (Renneson et al., 2011; Matangkasombut et al., 2014). Baseados nessas informações, verificamos se a infecção pelo ZIKV modularia a expressão de CD1d em esplenócitos de camundongos selvagens e nocautes.

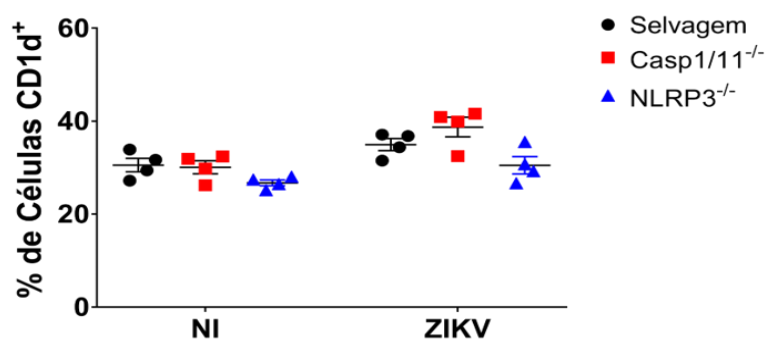
Ao analisar os histogramas representativos (Figura 20A), observamos uma diminuição da expressão de MHC-II no grupo infectado por ZIKV (32,9%) quando comparado ao grupo controle NI (45,7%) nos camundongos selvagens. Ao analisarmos os camundongos nocautes para as caspases-1/11, foi observado um efeito oposto aos camundongos selvagens, ou seja, um aumento da expressão de MHC-II nas células do grupo ZIKV (50,1%) quando comparado ao grupo controle NI (30%). Já nos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>, observamos um efeito semelhante aos camundongos selvagens. Houve uma diminuição na expressão de MHC-II nas células do grupo ZIKV (36,9%) quando comparados ao grupo NI (52,2%).

Ao analisarmos o gráfico de barras com um aumento do N amostral, verificamos que a infecção por ZIKV não induz aumento significativo na expressão de CD1d nos esplenócitos de camundongos selvagens infectados, quando comparados aos camundongos NI, e esse resultado foi independente da presença das proteínas caspases-1/11 e NLRP3 (Figura 20B).

A)



B)



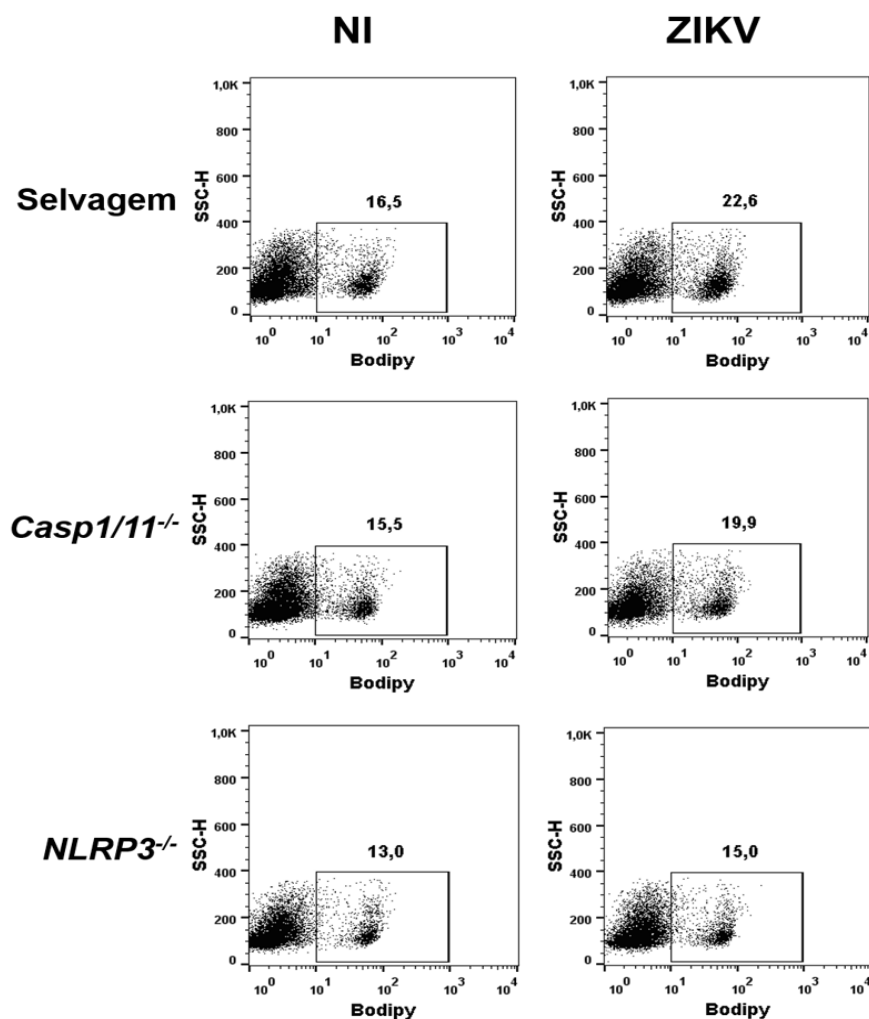
**Figura 20 - Análise da expressão de CD1d em esplenócitos de camundongos selvagens, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>* infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e *NLRP3<sup>-/-</sup>* de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com anticorpo anti-CD1d-PE, e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05.

#### **5.14. A infecção por ZIKV induz um aumento na biogênese de Corpúsculos lipídicos em esplenócitos de camundongos selvagens imunocompetentes**

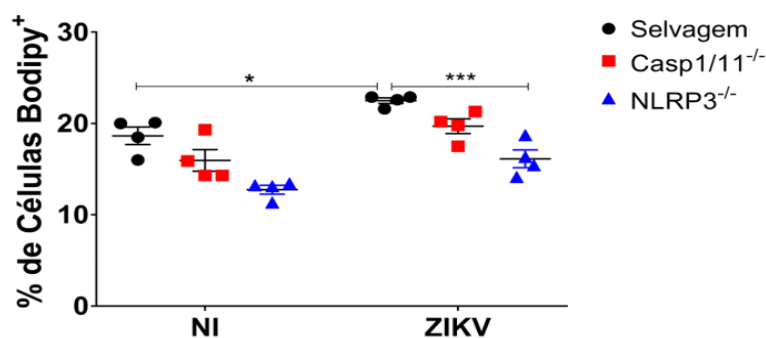
Os corpúsculos lipídicos (CL) são organelas intracelulares responsáveis pelo armazenamento de lipídeos neutros e desempenham um papel fundamental no metabolismo lipídico e celular (Walther and Farese, 2012; Hashemi and Goodman, 2015). No contexto de interação patógeno-hospedeiro, os CL são amplamente estudados e já se sabe que no contexto de infecções virais eles servem como sítios de replicação e montagem viral (Martins et al., 2018). Sabendo da importância da biogênese de CL nesse contexto, avaliamos se o ZIKV estaria modulando essa biogênese de CL nos esplenócitos de camundongos selvagens, bem como o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11.

Ao analisar os histogramas representativos (Figura 21A), observamos aumento da biogênese de CL nos esplenócitos dos camundongos selvagens, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>* infectados pelo ZIKV em comparação com os camundongos controles NI. Além disso, o aumento da biogênese de CL nos esplenócitos dos camundongos selvagens infectados por ZIKV foi estatisticamente maior quando comparado aos camundongos *NLRP3<sup>-/-</sup>* infectados por ZIKV (Figura 21B). Mostrando que esse aumento na biogênese de CL induzida pela infecção por ZIKV é dependente da presença da proteína NLRP3.

A)



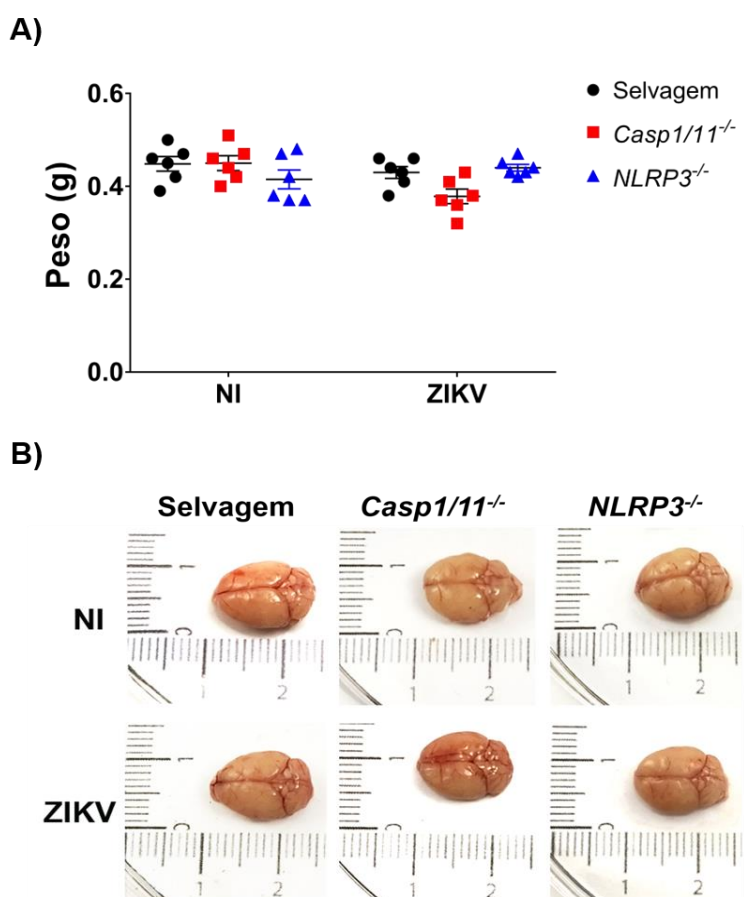
B)



**Figura 21 - Aumento da biogênese de Corpúsculos lipídicos nos esplenócitos de camundongos selvagens infectados por ZIKV dependente da presença de NLRP3.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e NLRP3<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os baços foram coletados e dissociados em esplenócitos. Estes foram marcados com a sonda Bodipy e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas (A) são representativos de um animal por grupo e o gráfico de barras (B) contém um N=4. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05. As diferenças estatísticas entre os grupos foram representados por asteriscos em que \* p>0,05 e \*\* p>0,01.

### 5.15. Não foi detectado alteração no peso e no tamanho do cérebro em camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes após a infecção por ZIKV

O tropismo pelo cérebro e a indução de apoptose em células progenitoras neurais causados pelo ZIKV (Miner and Diamond, 2017) servem de base para explicar sua capacidade de prejudicar o desenvolvimento do cérebro fetal, causando microcefalia e outras lesões no desenvolvimento neurológico (Li et al., 2016; Tang et al., 2016). Sendo assim, avaliamos os possíveis efeitos da infecção por ZIKV a longo prazo em camundongos adultos selvagens imunocompetentes e o papel da ausência das proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 na infecção. Após 14 dias de infecção, sacrificamos os camundongos e coletamos os cérebros, pesamos e fotografamos. Entretanto, não observamos diferenças significativas no peso (Figura 22A) e tamanho dos cérebros (Figura 22B) de camundongos selvagens e nocautes infectados por ZIKV, quando comparados aos camundongos NI.

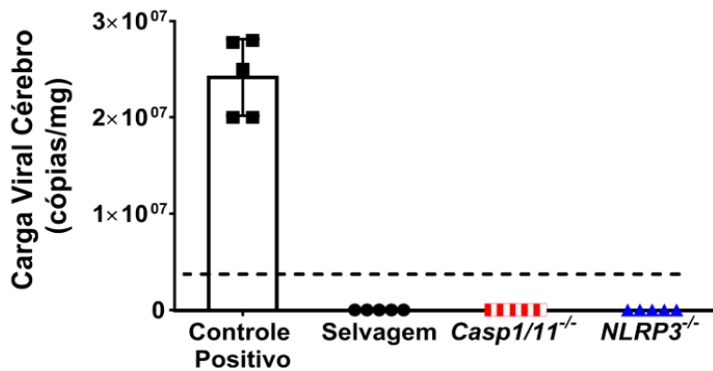


**Figura 22 - A infecção por ZIKV não altera o peso e tamanho dos cérebros de camundongos selvagens, Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (Casp1/11<sup>-/-</sup>) e NLRP3<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os cérebros foram coletados, pesados em balança e fotografados com câmera de celular. (A) O gráfico de barras de peso contém um N=6 e a escala é em gramas (g). (B) A foto é representativa de um único animal de cada grupo. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05.

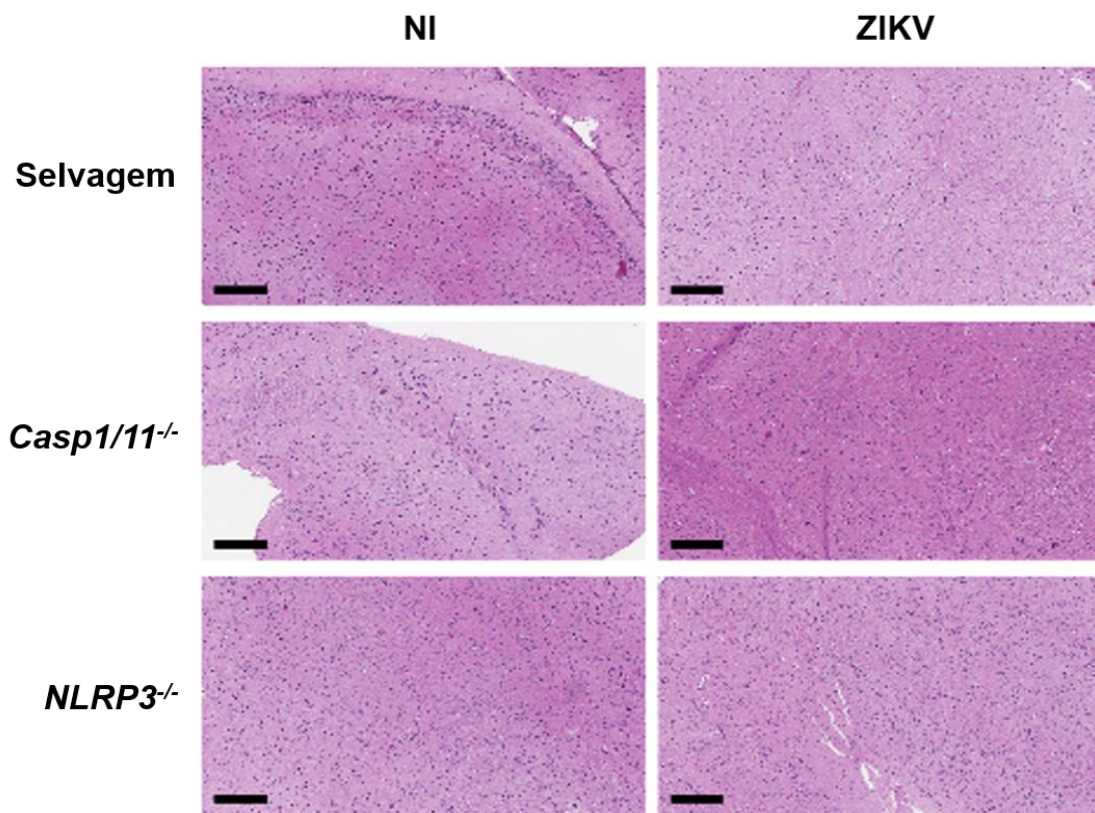
#### **5.16. A infecção por ZIKV não induz danos histopatológicos no cérebro em camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes**

Embora sabendo que nossos camundongos selvagens e nocautes não apresentam mais carga viral no soro após 3 dias de infecção, examinamos a presença de carga viral no cérebro desses camundongos, e como esperado não detectamos a presença de carga viral no cérebro dos camundongos selvagens e nocautes após a infecção por ZIKV (Figura 23A). Na busca por encontrar possíveis efeitos da infecção do ZIKV no cérebro dos camundongos analisados, fizemos análise histológica dos cérebros por marcação de hematoxilina e eosina e não encontramos achados histopatológicos significativos nos cérebros dos camundongos selvagens, Casp1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> infectados por ZIKV, quando comparado aos grupos NI (Figura 23B).

A)



B)

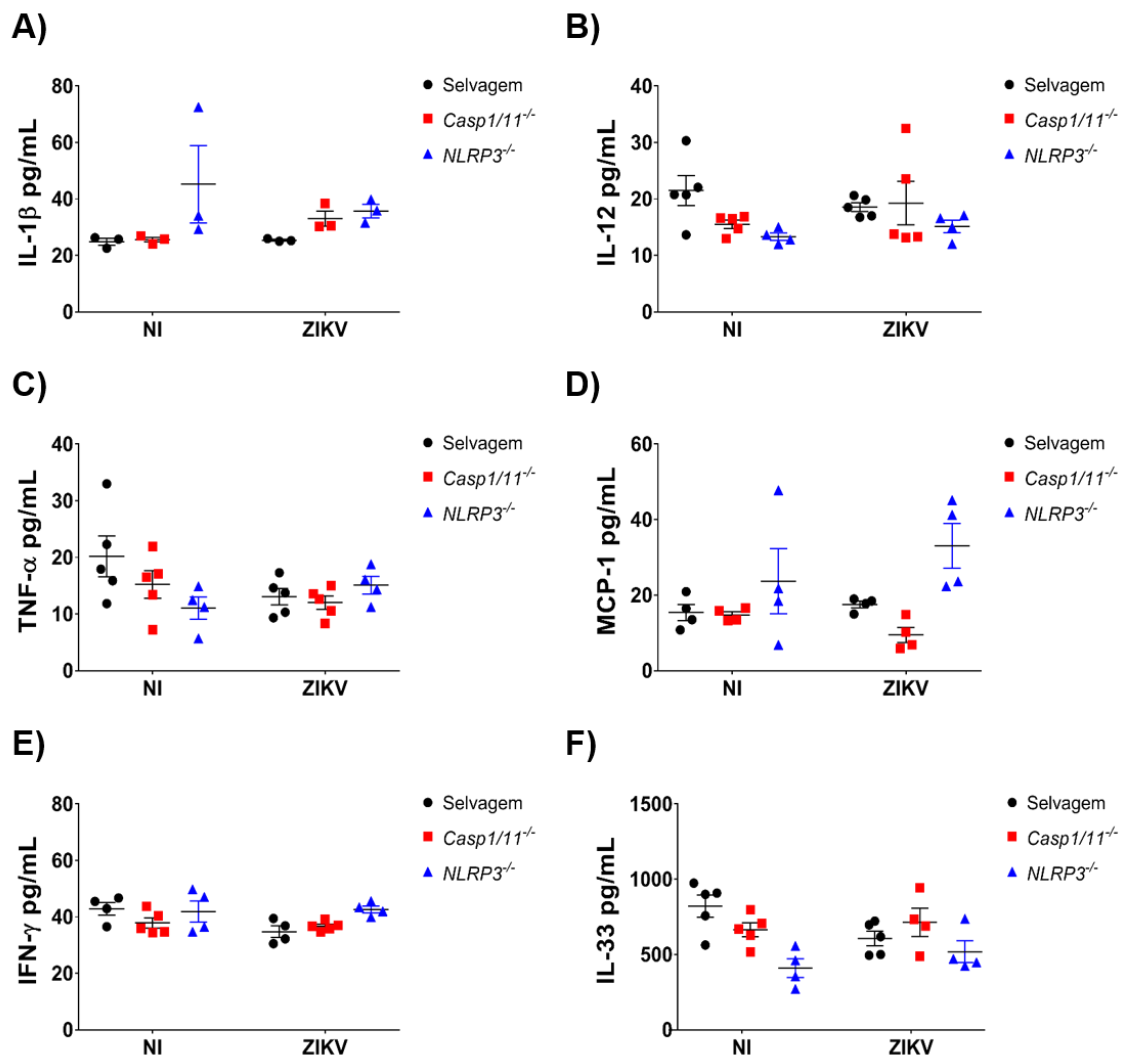


**Figura 23 - A infecção por ZIKV não induz danos histopatológicos nos cérebros dos camundongos selvagens, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>*.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e *NLRP3<sup>-/-</sup>* de oito semanas foram infectados i.p com  $10^5$  PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os cérebros foram coletados e em seguida submetidos à extração de RNA viral para detecção de carga viral por meio de rt-PCR. (A) O gráfico de barras que representa a carga viral detectada por rt-PCR contém um N=5 e como controle positivo foram usados antígenos virais retirados de cérebro de camundongos imunodeficientes. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de  $p > 0,05$ . (B) Prancha histológica, os cérebros foram coletados, lavados cuidadosamente com tampão PBS e fixados em 10% de formalina. Depois disso, os tecidos foram desidratados e embebidos em parafina. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As imagens das lâminas foram analisadas usando o software AperioImageScope 12.4.0, da LeicaBiosystems (CEP). As imagens foram editadas no Adobe Photoshop CC 2019, da Adobe (CEP), sem modificações de cor, níveis ou histogramas. Barra de escala: 200 $\mu$ m.



### 5.17. A infecção por ZIKV não induz modulação na secreção de citocinas no cérebro em camundongos selvagens imunocompetentes e nocautes

Parte do cérebro dos camundongos, em que foram extraídas proteínas, foi usada para quantificar e caracterizar a presença de citocinas e avaliar uma possível inflamação no cérebro causada pela infecção por ZIKV. Todavia, não foram observadas diferenças significativas na presença das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , MCP-, IFN- $\gamma$  e IL-33 entre o grupo infectado por ZIKV e o grupo NI nos camundongos selvagens, nem entre os camundongos infectados selvagens e nocautes (Figura 24A-F).



**Figura 24 - Análise de citocinas no cérebro de camundongos selvagens, *Casp1/11<sup>-/-</sup>* e *NLRP3<sup>-/-</sup>* infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem), Caspases-1/11<sup>-/-</sup> (*Casp1/11<sup>-/-</sup>*) e *NLRP3<sup>-/-</sup>* de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os animais foram sacrificados 14 dpi. Os cérebros foram coletados para a extração das proteínas para a quantificação das seguintes citocinas (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-12, (C) TNF- $\alpha$ , (D) MCP-1, (E) IFN- $\gamma$  e (F) IL-33 pela técnica de ELISA. O experimento foi realizado uma vez com um N=4-5. Os valores atípicos (outlier) foram retirados com o auxílio da calculadora de outlier do GraphPad Prisma. A estatística foi realizada usando o teste 2 way ANOVA não paramétrico com múltiplas comparações, com significância de p>0,05.

### **5.18. A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos selvagens imunocompetentes**

O Proteoma designa o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento (Hein et al., 2013). As proteínas são moléculas com as mais distintas funções celulares, sendo capazes de orquestrar a expressão de genes, catalisar reações metabólicas, além de compor a parte estrutural das células (Alberts et al., 2017). Importantes informações podem ser geradas com a análise por proteômica, como: I) Quais proteínas são expressas; II) Níveis de expressão destas proteínas; III) Modificações pós-traducionais; IV) Vias metabólicas que estão sendo moduladas; e V) A resposta das células a diferentes situações/tratamentos (Gooley, A. & Packer, 1997).

Embora a técnica de proteômica tenha sido utilizada em diversos estudos *in vitro* com ZIKV (Jiang et al., 2018; Scaturro et al., 2018, 2019), estudos utilizando infecções em modelos murinos utilizando essa técnica ainda são escassos na literatura até o presente momento. Portanto, no fim do período de infecção, coletamos os cérebros infectados e não infectados, extraímos as proteínas, e o extrato proteico foi analisado por cromatografia líquida e espectrometria de massas.

A primeira condição analisada foi entre os camundongos selvagens infectados com ZIKV e os NI. Foram identificadas 49 proteínas reguladas entre as condições, que permitiram o agrupamento das replicatas e a distinção entre as condições, conforme ilustrado na análise dos principais componentes (PCA) (Figura 25A). Usando o critério adicional de exclusão, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos, reduzindo para 9 proteínas com abundância diferencial significativa. Dessa forma foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando a plataforma MetaboAnalyst e pelo programa Progenesis. Que geraram um mapa de calor (Heat Map) da correlação entre as condições (NI e ZIKV) por perfis de abundância para as 9 principais proteínas (Figura 25B) e os Variable Importance Projection scores (VIP-scores), indicando as proteínas que melhor discriminam entre as condições (Figura 25C).

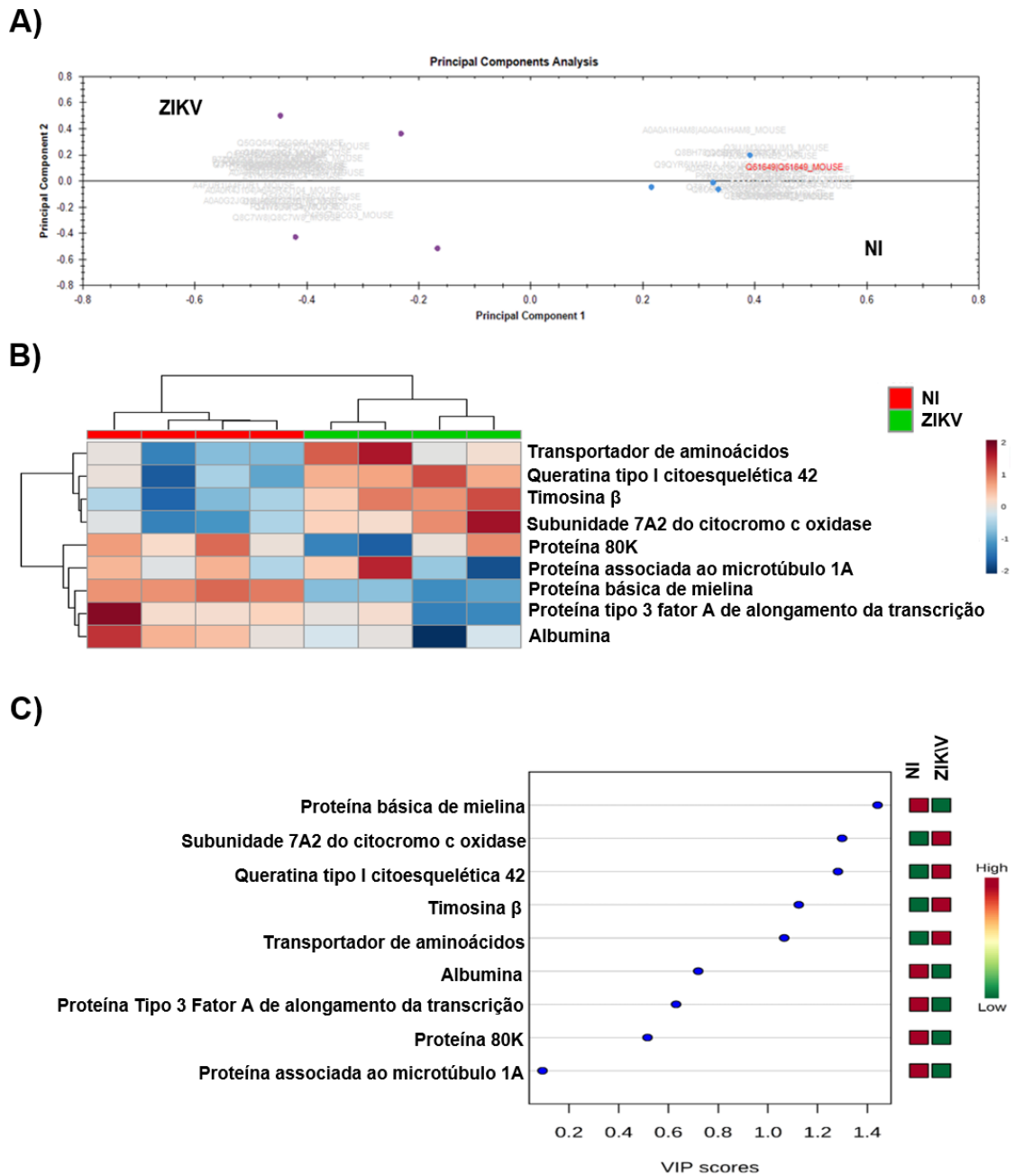
Ao analisarmos o perfil de abundância das 9 proteínas que melhor discriminaram entre as condições ZIKV e NI, vimos que, no cérebro dos camundongos selvagens, a infecção por ZIKV aumenta a abundância relativa das proteínas:

- **Queratina tipo I citoesquelética 42:** que é uma proteína do citoesqueleto celular e está envolvida na organização do citoplasma celular (Randell et al., 2006).

- **Timosina  $\beta$** : proteína que desempenha um papel importante na organização do citoesqueleto. Liga-se e sequestra monômeros de actina e, portanto, inibe a polimerização de actina (Sanders et al., 1992).
- **Transportador de aminoácidos**: transportador simporte de glutamato de alta afinidade glial (Reichenbach et al., 2018).
- **Subunidade 7A2 do Citocromo C oxidase mitocondrial**: esta proteína está envolvida na via de fosforilação oxidativa, que faz parte do metabolismo energético (Pérez-Pérez et al., 2016).

Averiguamos também que, no cérebro dos camundongos selvagens, a infecção por ZIKV diminui a abundância relativa das proteínas:

- **Proteína básica da mielina**: é uma proteína considerada importante no processo de mielinização dos nervos do sistema nervoso (Boggs, 2006).
- **Albumina**: é uma proteína que se liga à água,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ácidos graxos, hormônios, bilirrubina e drogas. Sua principal função é a regulação da pressão osmótica do sangue (M et al., 1997).
- **Proteína tipo 3 fator de alongamento da transcrição A**: está envolvida na regulação da transcrição (Wind and Reines, 2000).
- **Proteína 80k**: é uma proteína ligante de actina e calmodulina e é um substrato para a proteína quinase C (Sakai et al., 1992).
- **Proteína associada aos microtúbulos 1A**: é uma proteína estrutural envolvida na ponte cruzada filamentosa entre os microtúbulos e outros elementos do citoesqueleto (Halpain and Dehmelt, 2006).



**Figura 25 - A infecção por ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos selvagens imunocompetentes.** Camundongos C57BL/6J (Selvagem) de oito semanas foram infectados i.p com  $10^5$  PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. Os cérebros foram coletados e extraídas as proteínas. O extrato proteico foi analisado por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas. (A) Análise de principais componentes (PCA), em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Os pontos roxos representam o grupo ZIKV e os pontos azuis o grupo não infectado (NI). (B) Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e o agrupamento de condições. (C) VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. Análise realizada com o  $N = 4$ . As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância).

### 5.19. A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro dependente do NLRP3

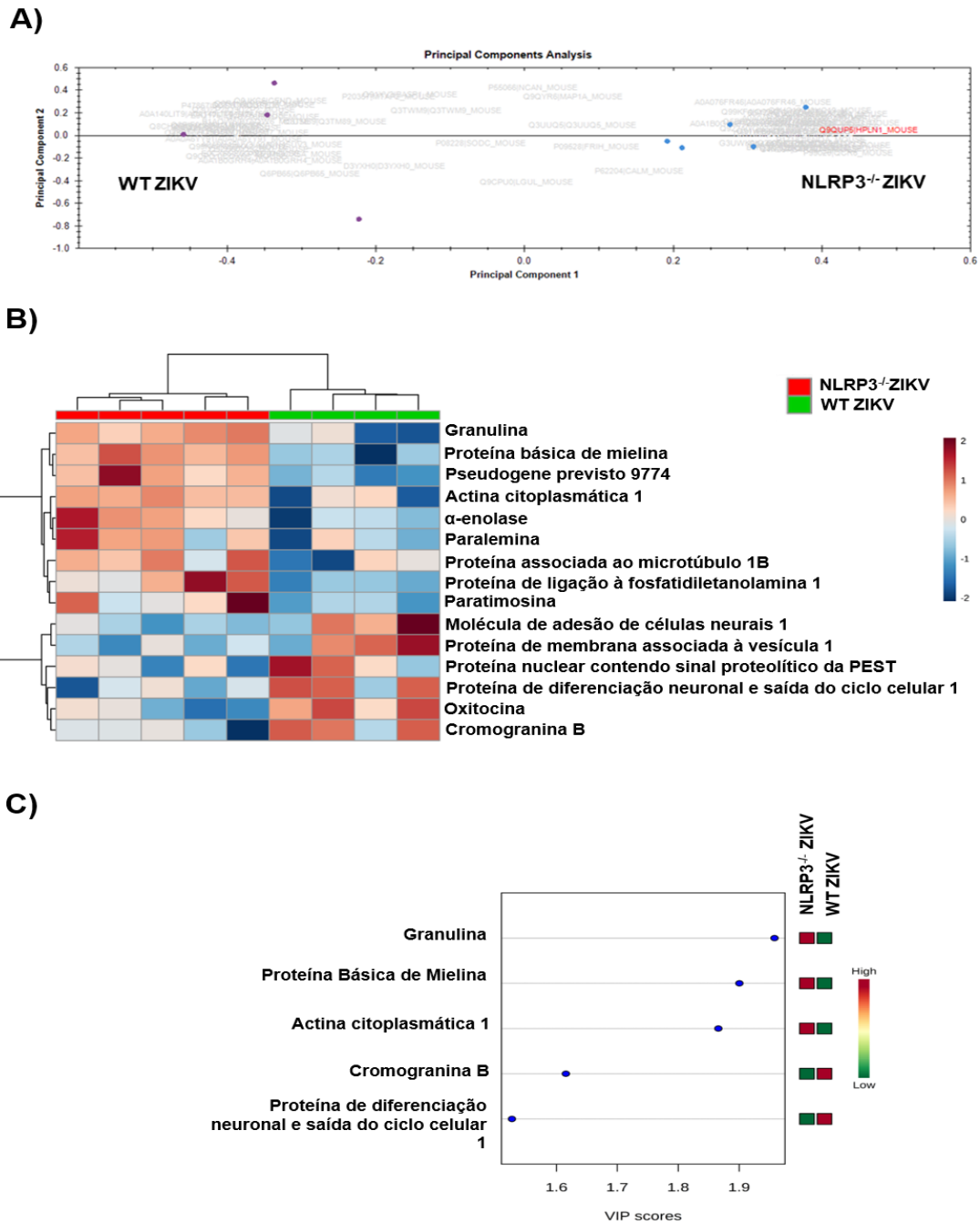
Após verificar que a infecção pelo ZIKV modula a expressão e abundância de proteínas no cérebro de camundongos selvagens (WT), analisamos se a ausência da proteína NLRP3 altera o perfil de proteínas cerebrais moduladas pela infecção por ZIKV. Ao compararmos as condições ZIKV WT e ZIKV NLRP3<sup>-/-</sup> foram identificadas 68 proteínas reguladas, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre as condições, conforme ilustrado na análise dos principais componentes (PCA) (Figura 26A). Usando o critério adicional de exclusão, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos, reduzindo para 27 proteínas com abundância diferencial significativa. Dessa forma foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando a plataforma MetaboAnalyst e pelo programa Progenesis que geraram um mapa de calor (Heat Map) da correlação entre as condições (ZIKV WT e ZIKV NLRP3<sup>-/-</sup>) por perfis de abundância para o conjunto das 15 proteínas com menor p-valor (Figura 26B) e os VIP-scores, indicando as 5 proteínas que melhor discriminaram entre as condições (Figura 26C).

Ao analisar o perfil de abundância das 5 proteínas que melhor discriminaram entre as condições ZIKV WT e ZIKV NLRP3<sup>-/-</sup>, vimos que, no cérebro dos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> quando comparados aos cérebros de camundongos selvagens, o ZIKV aumenta a abundância relativa das proteínas:

- **Granulina:** proteína secretada que atua como um regulador chave da função lisossomal e como um fator de crescimento envolvido na inflamação, cicatrização de feridas e proliferação celular (Bateman and Bennett, 1998).
- **Proteína básica de mielina:** proteína que contribui para a integridade estrutural da bainha de mielina de um nervo (Boggs, 2006).
- **Actina citoplasmática 1:** uma proteína membro da família de proteínas da actina, tem como função a motilidade e contração celular (Drazic et al., 2018).

Investigamos também que no cérebro dos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> quando comparados aos cérebros de camundongos selvagens, o ZIKV diminui a abundância relativa das proteínas:

- **Cromogranina B:** é uma proteína presente nos grânulos secretórios de uma grande variedade de células endócrinas e neuroendócrinas. Há evidências de que funcionam como pró-hormônios, liberando inúmeros fragmentos de peptídeos, para os quais atividades autócrinas, parácrinas e endócrinas têm sido demonstradas *in vitro* e *in vivo*. A bioquímica intracelular das graninas inclui ligação com Ca<sup>2+</sup>, ATP e catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) no interior das vesículas de armazenamento dos hormônios (Huh et al., 2003; Bartolomucci et al., 2011).
- **Proteína de diferenciação neuronal e saída do ciclo celular 1:** é um modulador específico da linhagem neuronal envolvido na sincronização da saída do ciclo celular e na diferenciação de precursores neuronais e possui um papel crítico durante a neurogênese (Gaitanou et al., 2019).



**Figura 26 - A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>.** Camundongos C57BL/6J (WT) e NLRP3<sup>-/-</sup> de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. Os cérebros foram coletados e extraídas as proteínas. O extrato proteico foi analisado por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas. (A) Análise de principais componentes (PCA), em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Os pontos roxos representam o grupo WT ZIKV e os pontos azuis, o grupo NLRP3<sup>-/-</sup> ZIKV. (B) Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e o agrupamento de condições. (C) VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. Análise realizada com o N = 4-5. As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância).

## 5.20. A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro dependente das Caspases-1/11

Ao verificar que a infecção pelo ZIKV modula a expressão e abundância de proteínas no cérebro de camundongos Selvagens e NLRP3<sup>-/-</sup>, fomos analisar se a ausência das Caspases-1/11 altera o perfil de proteínas cerebrais moduladas pela infecção por ZIKV. Ao compararmos as condições ZIKV WT e ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup> foram identificadas 206 proteínas reguladas, que permitiram o agrupamento de replicatas e distinção entre as condições, conforme ilustrado na análise dos principais componentes (PCA) (Figura 27A). Usando o critério adicional de exclusão, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos, reduzindo para 90 proteínas com abundância diferencial significativa. Dessa forma foi realizada uma segunda etapa de análise estatística utilizando a plataforma MetaboAnalyst e pelo programa Progenesis, que geraram um mapa de calor (Heat Map) da correlação entre as condições (ZIKV WT e ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup>) por perfis de abundancia para o conjunto das 40 proteínas com menor p-valor (Figura 27B) e os VIP-scores, indicando as 20 proteínas que melhor discriminaram entre as condições (Figura 27C).

Ao analisarmos o perfil de abundância das 20 proteínas que melhor discriminaram entre as condições ZIKV WT e ZIKV Casp1/11<sup>-/-</sup>, vimos que, no cérebro dos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> quando comparados aos cérebros de camundongos selvagens, o ZIKV aumenta a abundância relativa das proteínas:

- **Aspartato aminotransferase:** catalisa a transaminação irreversível do metabólito L-triptofano em L-quinurenina para formar ácido quinurênico (KA). Tem um papel fundamental no equilíbrio redox NAD (H) intracelular. É importante para a troca de metabólitos entre a mitocôndria e o citosol e para o metabolismo de aminoácidos. Facilita a absorção celular de ácidos graxos livres de cadeia longa (Zhou et al., 1995; Han et al., 2011).
- **Cromogranina B:** além das funções já descritas acima. A cromogranina B está associada a algumas doenças humanas, como esquizofrenia, doença de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Lechner et al., 2004).
- **Reticulon-1:** também conhecido como proteína neuroendócrina-específica (NSP), estão associados ao retículo endoplasmático e estão envolvidos na secreção neuroendócrina ou no tráfego de membrana nas células neuroendócrinas (Steiner et al., 2004).
- **Citocromo B5 tipo B:** é uma hemoproteína ligada à membrana mitocondrial de 146 aminoácidos que atua como um transportador de elétrons para várias oxigenases ligadas à membrana (Schenkman and Jansson, 2003).
- **Proteína 1 que interage com a - proteína serina quinase dependente de cálcio/calmodulina (CASK) - (Caskin1):** Caskin1 contribui para um amplo espectro de fenótipos comportamentais, incluindo marcha, nocicepção, memória e resposta ao estresse, em amplas regiões do sistema nervoso central (Katano et al., 2018).
- **Dineína citoplasmática 1, cadeia intermediária 1:** a dineína citoplasmática 1 é importante para os neurônios porque transporta sinais e organelas essenciais de locais distais ao corpo celular (Schiavo et al., 2013).
- **Parvalbumina:** é uma proteína de albumina de ligação ao cálcio, presente em neurônios GABAérgicos no sistema nervoso e desempenha importante papel em

muitos processos fisiológicos, como na regulação do ciclo celular, produção de segundos mensageiros, contração muscular, organização dos microtúbulos e fototransdução (Caillard et al., 2000).

- **Clatrina de Cadeia leve A:** a clatrina forma revestimentos em vesículas que controlam a endocitose do receptor, influenciando assim a sinalização celular (Wu et al., 2016).
- **Transportador de aminoácido excitatório 2:** transportador de aminoácidos de alta afinidade, dependente de sódio, que medeia a absorção de L-glutamato, L-aspartato e D-aspartato (Kirschner et al., 1994; Sutherland et al., 1995; Utsunomiya-Tate et al., 1997). É essencial para a rápida remoção do glutamato liberado da fenda sináptica e para encerrar a ação pós-sináptica do glutamato (Tanaka et al., 1997).
- **Fator de troca de nucleotídeo de guanina Rho (GEF) 26:** ativa Rho G GTPase promovendo a troca de GDP por GTP. Necessário para a formação de rugas na membrana durante a macropinocitose (Ellerbroek et al., 2004) e para a formação de estruturas em forma de copo durante a migração transendotelial de leucócitos (Van Buul et al., 2007).

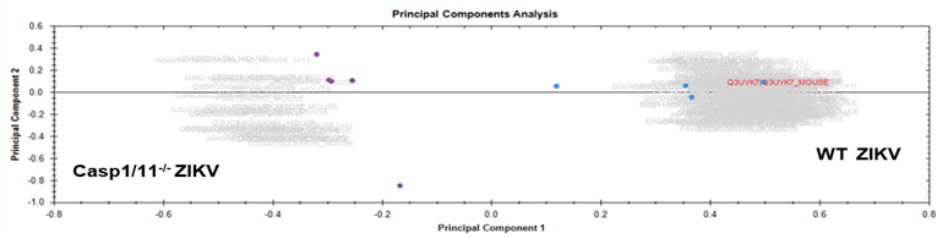
Verificamos também que no cérebro dos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> quando comparados aos cérebros de camundongos selvagens, o ZIKV diminui a abundância relativa das proteínas:

- **Proteoglicano de sulfato de condroitina 5:** é um componente importante da matriz extracelular do cérebro, pois está envolvido no desenvolvimento neural, localização e orientação dos axônios, plasticidade e também regeneração após lesão no sistema nervoso (Kwok et al., 2012).
- **Descarboxilase de D-dopacromo:** é uma enzima que catalisa a reação química D-dopacromo em 5,6-dihidroindol + CO<sub>2</sub>. Também é conhecida como DopacromoTautomerase (DDT) ou MIF-2 (Fator de inibição da migração de macrófagos 2). O DDT tem uma homologia com o MIF e ambos apresentaram características biológicas comuns (Sugimoto et al., 1997, 1999).
- **Glicoproteína oligodendrócito-mielina:** é um potente inibidor do crescimento de neuritos em neurônios e contribui significativamente para a atividade inibitória associada à mielina do SNC (Wang et al., 2002).
- **Obliterador indutor de morte 1:** proteína necessária para o desenvolvimento inicial de células-tronco embrionárias (Liu et al., 2014) e fator de transcrição pró-apoptótico (García-Domingo et al., 2003).
- **Subunidade 6C do citocromo C oxidase:** componente da citocromo c oxidase, a última enzima da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial que impulsiona a fosforilação oxidativa (Lenka et al., 1998).
- **Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH):** é uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, é a 6ª etapa na quebra glicolítica da glicose. O GAPDH é um mediador geral da morte celular e usa a sua translocação nuclear como um mecanismo de sinalização (Sawa et al., 1997).
- **Histona H1.3:** A proteína histona H1 se liga ao DNA ligante entre os nucleossomos, formando a estrutura macromolecular conhecida como fibra de cromatina (Fan et al., 2003).
- **Glutationa hidrolase 7:** esta proteína está envolvida na via metabólica da glutatona, clivando conjugados de glutatona e faz parte do metabolismo do enxofre (Deponte, 2013).

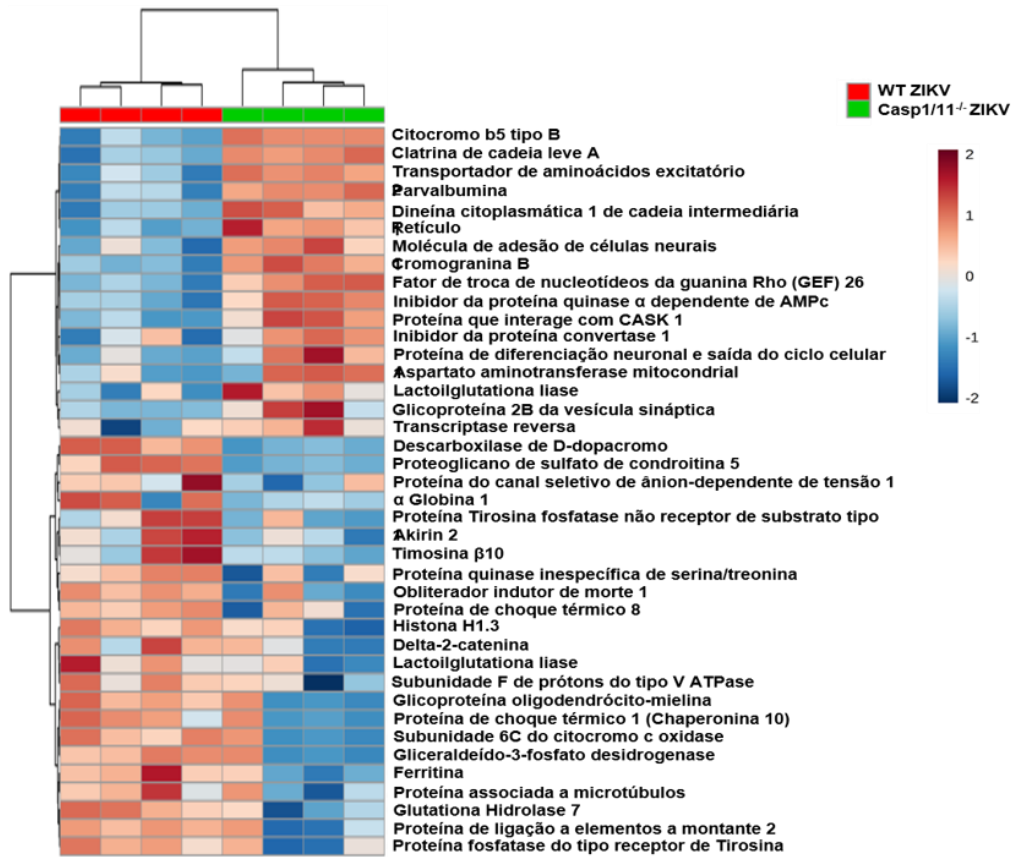


- **Proteína de ligação de elemento 2 distante a montante:** é uma proteína importante no tráfego de mRNA. Medeia a inclusão de exon em transcritos que estão sujeitos a splicing alternativo específico de tecidos. Pode interagir com o DNA de fita simples e ativar a expressão gênica. Também está envolvido na degradação de mRNAs inerentemente instáveis que contêm elementos ricos em Adenina-Uracila (AREs) em sua 3'-UTR, possivelmente recrutando maquinaria de degradação para mRNAs contendo ARE (Briata et al., 2011).
- **Proteína de choque térmico de 10 kDa:** Chaperona mitocondrial responsável pela importação de proteínas mitocondriais e montagem macromolecular. Junto com Hsp60 (Proteína de choque térmico 60), facilita o dobramento correto de proteínas importadas. Pode também prevenir o dobramento incorreto e promover o redobramento e a montagem adequada de polipeptídeos não dobrados gerados sob condições de estresse na matriz mitocondrial (Jia et al., 2011).

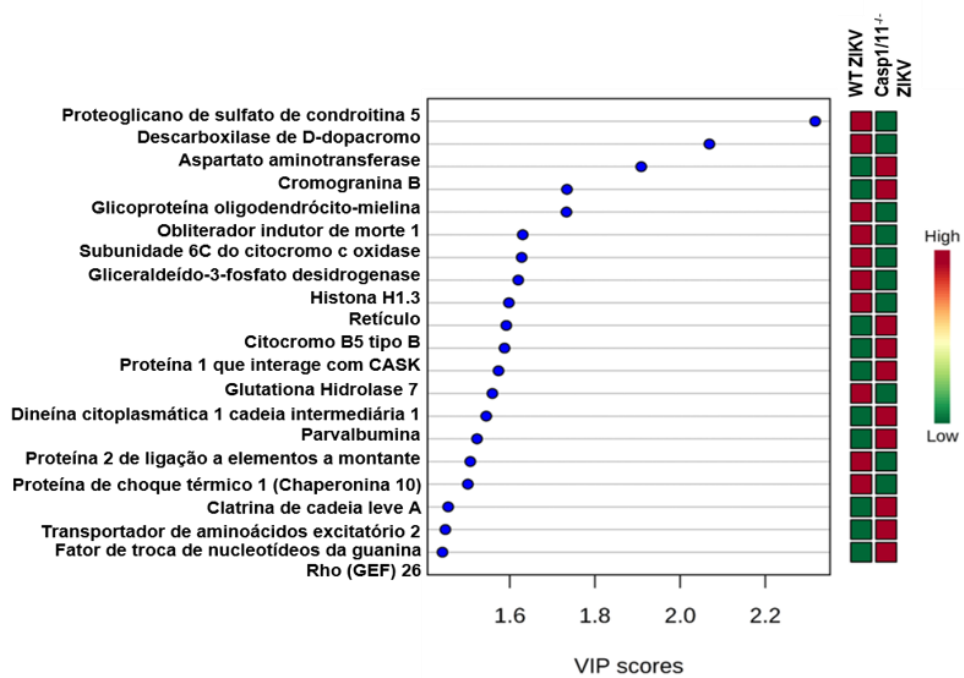
A)



B)



C)



**Figura 27 - A infecção pelo ZIKV induz uma modulação do perfil e abundância de proteínas no cérebro de camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup>.** Camundongos C57BL/6J (WT) e nocautes para as Caspases-1/11 (Casp1/11<sup>-/-</sup>) de oito semanas foram infectados i.p com 10<sup>5</sup> PFU/mL de ZIKV. Os camundongos foram sacrificados 14 dpi. Os cérebros foram coletados e extraído as proteínas. O extrato proteico foi analisado por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas. (A) Análise de principais componentes (PCA), em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam replicatas. Os pontos roxos representam o grupo Casp1/11<sup>-/-</sup> ZIKV e os pontos azuis o grupo WT ZIKV. (B) Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e o agrupamento de condições. (C) VIP scores das proteínas que melhor discriminam entre as condições. Análise realizada com o N = 4. As proteínas quantificadas foram avaliadas estatisticamente quanto à diferença entre as condições (ANOVA) e agrupadas por análise multivariada (PCA e agrupamento de acordo com perfis de abundância).

## 6. Discussão

No presente trabalho, mostramos que camundongos imunocompetentes do tipo selvagem apresentaram alteração da composição da microbiota intestinal, infiltração de leucócitos no cólon e dano epitelial intestinal 14 dias após a infecção pelo ZIKV.

Embora Thackray e colegas tenham sugerido que a depleção bacteriana intestinal esteja relacionada à gravidade das infecções por Flavivírus (Thackray et al., 2018), nenhum estudo anterior explorou os efeitos da infecção por Flavivírus na abundância relativa de taxas bacterianas específicas no intestino de camundongos. Do mesmo modo, a disbiose induzida por vírus pode estar ligada a uma melhoria de sua patogenicidade, demonstrando que tanto a infecção viral como a composição bacteriana intestinal têm potencial para modular um ao outro (Kane et al., 2011; Kuss et al., 2011; Erickson et al., 2018). Apesar da relevância que essa intercomunicação tem recebido, o papel de infecções por Flavivírus, em especial o ZIKV, na microbiota intestinal nunca foi investigado até esse momento, portanto, esta tese mostrou pela primeira vez a caracterização de como o ZIKV poderia alterar a microbiota intestinal de camundongos imunocompetentes.

A maioria das bactérias residentes no intestino são classificadas como pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes (Abenavoli et al., 2019; Lin et al., 2019b), seguidos pelas Proteobactérias e Actinobactérias (Rinninella et al., 2019). Nessa tese mostramos que a microbiota intestinal de camundongos imunocompetentes infectados com ZIKV apresentaram uma diminuição na abundância dos filos Firmicutes e Actinobactérias em relação aos camundongos selvagens imunocompetentes não infectados.

Firmicutes são bactérias gram-positivas anaeróbicas compostas de três classes: Clostridia, Bacilli e Mollicutes (Abenavoli et al., 2019). Esses procariontes são importantes contribuintes para a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como acetato, propionato e butirato (Miller and Wolin, 1996), dentre esses, o butirato é o SCFAs que mais possui propriedades anti-inflamatórias, pois prejudica a migração de leucócitos (Vinolo et al., 2011), diapedese (Böhmig et al., 1997) e aumenta a integridade da barreira intestinal, facilitando a montagem de junções estreitas (Peng et al., 2009) e influenciando a produção de muco (Gaudier et al., 2004). Os outros SCFAs derivados da microbiota estão associados à manutenção da barreira intestinal (Bäumler and Sperandio, 2016) por meio de um aumento da expressão de proteínas de junção em células epiteliais do cólon, que reduzem a permeabilidade da mucosa e, conseqüentemente, inibem a produção de citocinas inflamatórias (Parada Venegas et al., 2019).

Outro táxon que diminuiu drasticamente em animais infectados com ZIKV é o filo Actinobacteria. Ele também desempenha papéis importantes na manutenção da homeostase intestinal por meio da secreção de SCFAs que protegem contra infecção enteropatogênica (Fukuda et al., 2012) e contribuem na integridade da barreira intestinal (Scott et al., 2014). O fato dos membros desse filo serem usados atualmente como probióticos destaca seus papéis benéficos para a manutenção da saúde intestinal (Binda

et al., 2018). Wang et al. mostraram que pacientes com vírus da Hepatite B apresentaram níveis mais baixos de Actinobacteria no intestino, especificamente da família Coriobacteriaceae, indicando que infecções virais também podem afetar a abundância de Actinobactérias no intestino (Wang et al., 2017c). Da mesma forma que Wang, mostramos uma diminuição na abundância de componentes do filo Actinobactérias, como membros da família Coriobacteriaceae, no grupo de camundongos infectados com ZIKV.

Em contraste, os filos Deferribacteres e Spirochaetes, significativamente aumentados em animais infectados, estão associados à patologia prejudicial em animais (Berry et al., 2015; Brüßow, 2020). Deferribacteres são bastonetes Gram-negativos que formam endósporos ou bactérias em forma de vibrio que produzem energia por meio de respiração anaeróbica usando ferro, manganês ou nitrato, e também podem produzir energia por fermentação (Greene et al., 1997). Os membros desse filo são organizados em uma única classe, ordem e família (Alauzet and Jumas-Bilak, 2014). Embora nenhum membro desse filo tenha sido associado a doenças em humanos, em roedores, um gênero conhecido como *Mucispirillum sp.* está associado ao muco intestinal (Robertson et al., 2005) e possui sistemas especializados para lidar com o estresse oxidativo durante a inflamação (Berry et al., 2012; Smith et al., 2012). *Mucispirillum sp.* expressa proteínas efetoras dos sistemas de secreção e pode modificar a expressão de genes relacionados à mucosa do hospedeiro (Loy et al., 2017).

Experimentos usando camundongos tratados com sulfato de sódio dextrano (DSS), um modelo animal de colite, mostraram que esses animais apresentam maior abundância de Deferribacteres no intestino em comparação com animais não tratados, associando fortemente este filo com a inflamação intestinal (Berry et al., 2012). O DSS é amplamente utilizado devido à sua simplicidade e semelhança com a colite ulcerativa humana (CUH) (Okayasu et al., 1990). Embora os mecanismos pelos quais o DSS afeta a homeostase intestinal ainda não estejam totalmente descritos, acredita-se que esse colitogênio químico induza a colite após danificar a monocamada epitelial no intestino grosso (Eichele and Kharbanda, 2017).

O filo Spirochaetes foi o que apresentou maior abundância no grupo infectado com ZIKV quando comparado com outros filios e em relação ao grupo não infectado. Esta foi uma descoberta surpreendente, uma vez que muitas espécies de espiroquetas são patógenos importantes para animais e humanos, causando sífilis, doença de Lyme e leptospirose (Cullen et al., 2004). As espiroquetas são bactérias Gram-negativas em formato de hélice que tendem a se mover em um movimento ondulado em forma de hélice. A maioria das espiroquetas é de vida livre e anaeróbica, mas há exceções. Seu metabolismo é quimiorganotrófico, usando carboidratos ou aminoácidos como fontes de carbono e energia (Brenner et al., 2005). A principal característica que diferencia esse filo de outros é a presença da endoflagelo, que se acredita ser responsável pelas patologias e diversidade desse filo (Ren et al., 2003).

Além disso, a infecção pelo ZIKV em camundongos imunocompetentes levou ao aumento da abundância do gênero *Treponema*, que é o gênero de bactérias causador de

doenças pertencentes à família Spirochaetaceae (Giacani and Lukehart, 2014), ressalte-se que um aumento da presença de *Treponema* nas fezes é geralmente classificado como não saudável (Brüssow, 2020), logo, acreditamos que esse aumento pode ser relevante para efeitos gastrointestinais deletérios durante a infecção por ZIKV. Embora não existam estudos relacionados ao aparecimento de doenças oportunistas decorrentes da infecção pelo ZIKV, já é conhecido que a infecção crônica por espiroquetas e a coinfeção com outras bactérias e vírus estão diretamente relacionadas ao aparecimento e à manifestação da doença de Alzheimer (Miklossy, 2015).

Estudos em humanos mostraram que a infecção por ZIKV pode afetar a função gastrointestinal (GI), uma vez que alguns pacientes relataram sintomas como dor abdominal, náuseas, diarreia e vômitos (Barrera-Cruz et al., 2016; Murray et al., 2017; Slavov et al., 2018). Análises proteômicas de células do cólon humano infectadas com ZIKV relacionaram este vírus com anormalidades inflamatórias intestinais e colite (Glover and Coombs, 2020), possivelmente explicando o envolvimento GI relatado em alguns pacientes com ZIKV. Em contraste, o ZIKV só é capaz de se replicar efetivamente em camundongos que apresentam resposta imune antiviral prejudicada (Nazerai et al., 2018). Esta imunidade interrompida favorece a sobrevivência do ZIKV, o que resulta em uma patologia que mostra envolvimento intestinal, incluindo inflamação do intestino (Li et al., 2018a) e dilatação intestinal (White et al., 2018), alterações que indicam o ZIKV como capaz de induzir processos inflamatórios em camundongos no trato GI.

Embora animais imunocompetentes não apresentem complicações intestinais macroscópicas, neste estudo detectamos evidências de respostas inflamatórias no tecido do cólon, pois descobrimos a ocorrência de dano epitelial e infiltração leucocitária no cólon de camundongos 14 dpi. A atividade inflamatória já foi associada a alterações microbianas intestinais, uma vez que Lupp e colegas indicaram que a inflamação mediada pelo hospedeiro desencadeada por agentes de infecção pode alterar a comunidade microbiana do cólon (Lupp et al., 2007). À medida que bactérias pró-inflamatórias e patogênicas aumentam sua abundância no intestino (Zeng et al., 2017), um aumento da permeabilidade intestinal, da disfunção imunológica e danos às células epiteliais intestinais são observados (Shen et al., 2018). Conforme detalhado nesta tese, as comunidades que descobrimos aumentaram em camundongos infectados com ZIKV e estão relacionadas a fenótipos prejudiciais à saúde. Além disso, os táxons bacterianos comumente associados à homeostase do trato GI parecem ser impactados negativamente pela infecção por ZIKV.

Nossa hipótese é que a infecção por ZIKV de camundongos selvagens imunocompetentes desencadeia inflamação intestinal durante uma fase inicial da infecção que leva à disbiose intestinal, que é caracterizada pelo crescimento de patobiontes e interrupção de comunidades bacterianas benéficas (Chow and Mazmanian, 2010). Como mostramos dados que indicam que a infecção por ZIKV favorece o crescimento de filos bacterianos associados a patologia deletéria e reduz drasticamente os filos bacterianos implicados na integridade da barreira intestinal e homeostase intestinal, sugerimos que

essas alterações possam ter influenciado a ocorrência de infiltração de cólon de leucócitos e danos nos tecidos detectada pelo nosso grupo.

Neste estudo, não detectamos qualquer modulação das citocinas secretadas pelo cólon, no entanto, as comunidades microbianas podem influenciar a secreção de outros mediadores, como IL-8 e MCP-1 (Louis and Flint, 2009, 2017). Além disso, a quantificação de um conjunto mais amplo de citocinas, quimiocinas ou mediadores lipídicos durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV tende a confirmar a relevância da disbiose microbiana intestinal nessa infecção. Uma vez que camundongos imunocomprometidos desenvolvam complicações intestinais macroscópicas, as análises microbianas intestinais desses animais devem corroborar a relevância dos dados da microbiota intestinal.

Um estudo recém-publicado forneceu uma caracterização imunopatológica detalhada da rota de transmissão anal do ZIKV em camundongos IFNAR<sup>-/-</sup>, em que o ZIKV infecta células dendríticas da mucosa e submucosa do epitélio intestinal, induzindo infiltração de células imunes e inflamatórias. Logo no primeiro dia após a infecção, já é possível observar um aumento de monócitos (CD11b+) e macrófagos (F4/80+) na mucosa retal de camundongos infectados, em seguida, com cerca de 3 dpi, há o aumento significativo de MCP-1 nos grupos infectados e há um aumento de células dendríticas (CD11c+) e leucócitos (CD45+) na mucosa retal em 7 dpi. Esses resultados sugerem que há respostas imunológicas aumentadas na mucosa retal logo após a infecção. No geral, células epiteliais intestinais e células dendríticas ajudam na infecção por ZIKV na mucosa retal (Martínez et al., 2020). Embora nosso estudo não tenha caracterizado os tipos celulares que foram recrutados no nosso modelo, o trabalho de Martínez reforça nosso dado em que mostramos que a infecção por ZIKV e a modulação da microbiota induz um recrutamento de leucócitos para o colón.

Uma vez que a composição e a função da microbiota impactam em uma infinidade de outras patologias (Wang et al., 2017b), pesquisas futuras devem determinar mais detalhadamente a influência da infecção pelo ZIKV nesta comunidade, como por meio do uso de camundongos fêmeas ou imunodeficientes, vias de infecção alternativas como subcutâneas ou intraperitoneal, outras cepas de ZIKV e outros momentos de infecção. Além disso, esforços experimentais adicionais devem avaliar a função GI como um meio de vincular as alterações da microbiota a motilidade intestinal, uma vez que White e outros implicaram a infecção por flavivírus com síndromes de dismotilidade intestinal (White et al., 2018).

Além disso, como a administração oral de antibióticos demonstrou aumentar a suscetibilidade dos camundongos à infecção grave de flavivírus, embora interferindo nas respostas das células T antivirais (Thackray et al., 2018) e possivelmente exacerbando os processos inflamatórios (Knoop et al., 2016; Bhaskaran et al., 2018), o emprego de tratamentos com antibióticos específicos deve ser útil para entender o papel da ausência da microbiota intestinal na infecção pelo ZIKV. Desse modo, descobrir a influência da infecção pelo ZIKV nas comunidades microbianas intestinais pode ser valioso para

determinar alvos terapêuticos para a infecção pelo ZIKV, além de prevenir e compreender melhor a patologia intimamente relacionada às condições de risco de vida como a SCZ (Siddique et al., 2019) e a SGB (de Siqueira et al., 2016).

Nessa tese, caracterizamos também a infecção por ZIKV em camundongos selvagens adultos imunocompetentes e camundongos nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 em um tempo de 14 dias após a infecção. Nossos dados mostraram que a infecção por ZIKV modulou citocinas séricas em camundongos selvagens e induziu uma modulação a nível proteico no cérebro de ambos os camundongos infectados.

Ao analisar a carga viral em diferentes dias, verificamos que nossos resultados estão de acordo com os achados de Li e colaboradores que demonstraram que, após uma infecção pela rota intraperitoneal de camundongos selvagens com ZIKV, há diminuição da carga viral após o terceiro dia de infecção (Li et al., 2018a). Embora, nenhum outro estudo tenha analisado a carga viral nos modelos de camundongos nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11, já esperávamos que esses camundongos apresentassem um perfil de carga viral no soro semelhante aos camundongos selvagens, visto que eles não são camundongos imunocomprometidos para a infecção por ZIKV.

Nossos resultados não mostraram modulação do peso dos camundongos após a infecção por ZIKV, esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Huang e colaboradores, que avaliaram a variação do peso de camundongos selvagens imunocompetentes por 5 dias após a infecção e não observaram modulação significativa no peso dos camundongos (Huang et al., 2017). Já para as análises de variação de peso corporal nos camundongos nocautes, um estudo feito por He e colaboradores mostrou que em camundongos neonatos nocautes para a proteína Caspase1 não há variação no peso desses camundongos após a infecção, em contrapartida, nos camundongos selvagens neonatos há uma diminuição no ganho de peso após a infecção (He et al., 2020). Porém, nosso estudo analisou camundongos adultos e trouxe essas primeiras análises em camundongos nocautes para as caspase1/11 e o inflamassoma NLRP3.

Após a análise de variação de peso, fomos averiguar por meio da dosagem de glicose, se a infecção por ZIKV poderia levar a uma condição de resistência à insulina. Porém não observamos modulação nos níveis de glicose dos camundongos selvagens e nocautes infectados com ZIKV quando comparados aos camundongos não infectados. Sabe-se que infecções virais, via indução de IFN- $\gamma$ , podem levar à resistência à insulina no músculo esquelético de camundongos, diminuindo a expressão de receptores de insulina e provocando uma hiperinsulinemia, o que leva a uma maior resposta antiviral via linfócitos TCD8. Além disso, em camundongos pré-diabéticos com resistência à insulina hepática causada por obesidade induzida por dieta, a infecção viral resultou na perda do controle glicêmico, fazendo com que esses camundongos pré-diabéticos desenvolvessem diabetes mellitus tipo 2 (Šestan et al., 2018).

Sintomas como febre, dor e mialgia, podem ser induzidos por citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13), conforme a expressão de seus níveis plasmáticos (Wallace et al., 2001; Macedo et al., 2007;



Hernandez et al., 2010). Estudos relacionando diretamente citocinas e a infecção pelo ZIKV demonstraram aumento significativo da IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 e TNF- $\alpha$  na fase aguda da doença, quando os resultados foram relacionados ao grupo controle (Tappe et al., 2016; Terzian et al., 2017; Naveca et al., 2018), e quando analisaram a fase convalescente (a partir de 10 dias de infecção), Tappe e colaboradores viram que as citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10 continuaram com níveis elevados no soro de pacientes, enquanto que as citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  não tiveram variação dos seus níveis durante a fase convalescente (Tappe et al., 2016).

Assim como estudos com pacientes humanos, análises do perfil de citocinas secretadas no soro de camundongos infectados por ZIKV foram realizadas por Dowall e colaboradores, que usando camundongos imunocomprometidos A129, infectados com baixa e alta carga viral, das linhagens africana e asiática do ZIKV, analisou a cinética da presença de diversas citocinas e quimiocinas no soro desses camundongos durante 14 dias (Dowall et al., 2020). Só foi visto variação nos níveis das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$  e IL-10, entre o terceiro e sétimo dia de infecção. As variações nos níveis de citocinas encontradas foram dependentes da carga viral e de linhagem específica.

Embora nossos resultados tenham demonstrado tanto uma diminuição da citocina pró inflamatória TNF- $\alpha$  quanto da citocina anti-inflamatória IL-10 no soro de camundongos selvagens imunocompetentes infectados por ZIKV, após 14 dias de infecção. Não analisamos e comparamos com o perfil dessas citocinas no soro em tempos iniciais, mas hipotetizamos que seja um reflexo do desbalanço que a infecção por ZIKV pode ter induzido nesses camundongos. Porém, tanto Wang e colaboradores, quanto He e colaboradores mostraram que a infecção por ZIKV em tempos precoces, em camundongos imunocompetentes adultos e neonatos, induz um aumento da secreção de IL-1 $\beta$  no soro dos camundongos, quando comparados aos grupos não infectados, e essa indução é dependente da ativação da Caspase-1 (Wang et al., 2018; He et al., 2020). O que sugere que outras citocinas pró inflamatórias possam estar sendo moduladas positivamente no início da infecção nesses modelos.

A seguir avaliamos se a infecção por ZIKV estaria induzindo uma esplenomegalia nos camundongos selvagens e nocautes, o que está de acordo com os achados por Huang e colaboradores que mostraram que o ZIKV induz uma esplenomegalia no baço de camundongos selvagens imunocompetentes após 7 dias de infecção (Huang et al., 2017), embora nossos dados sejam com 14 dias, ainda é possível perceber que os baços dos camundongos infectados estavam maiores que os baços dos camundongos não infectados. Já para a diminuição do tamanho e peso dos baços nos camundongos nocautes, Wang e colaboradores usando camundongos selvagens tratados com Y-VAD (Inibidor de Caspase-1), demonstraram que na ausência da ativação da Caspase-1, há uma diminuição do tamanho e peso do baço dos camundongos infectados por ZIKV quando comparados aos camundongos selvagens sem tratamento infectados por ZIKV (Wang et al., 2018), embora a análise dele seja apenas de 2 dias após a infecção, esse resultado

corrobora com o nosso resultado, onde observamos o mesmo fenômeno analisando após 14 dias de infecção e utilizando camundongos nocautes para as caspases-1/11.

Diversos trabalhos caracterizaram a resposta adaptativa de linfócitos T contra a infecção por ZIKV em camundongos selvagens imunocompetentes (Huang et al., 2017; Pardy et al., 2017; Winkler et al., 2017). Todos eles demonstraram uma cinética da resposta de linfócitos T CD4 e T CD8, em que o pico da resposta destas células ocorre por volta do sétimo dia de infecção, e o fenótipo da ativação dos linfócitos TCD4 é TH1, por meio da secreção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e do fator de transcrição T-bet (Pardy et al., 2017). Enquanto que a resposta dos linfócitos T CD8 é mediada pela expressão de INF- $\gamma$  e granzima B (Huang et al., 2017), as respostas imunológicas adaptativas ao ZIKV foram importantes para o controle da infecção e prevenção de infecções e danos no cérebro e testículos dos camundongos selvagens imunocompetentes (Winkler et al., 2017). A cinética da presença desses linfócitos no baço dos camundongos corrobora nossos resultados, pois todos eles mostram que, com 14 dias após a infecção, há uma normalização na quantidade dessas células no baço.

Ao analisar o recrutamento de macrófagos e linfócitos no baço dos camundongos nocautes infectados por ZIKV, nos deparamos com uma diminuição da presença de macrófagos no baço de camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> infectados com ZIKV quando comparados aos camundongos selvagens infectados. Estudos com o vírus da influenza demonstraram que o recrutamento de monócitos e neutrófilos é diminuído em camundongos Casp1<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> infectados, além das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  quando comparados aos camundongos selvagens infectados (Thomas et al., 2009), além disso, a resposta de linfócitos T CD4 e T CD8 específicos para influenza dependem de ASC e Caspase-1, mas não de NLRP3 (Ichinohe et al., 2009). Esses estudos mostram como infecções virais podem modular o recrutamento de células da reposta imune inata e adaptativa pela ativação do inflamassoma e de seus produtos.

Curiosamente, a ausência das caspases-1/11 e do NLRP3 promoveu um aumento no recrutamento de linfócitos TCD8 no baço dos camundongos infectados por ZIKV. Hipotetizamos que, nesses camundongos, o ZIKV não pode induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 e promover um escape da resposta mediada por IFNs, sendo assim, a reposta por IFNs nesses camundongos pode ser maior que nos camundongos selvagens, e um dos principais efeitos dos IFNs é o recrutamento de linfócitos TCD8. Além disso, a citocina IL-33, que é inibida pela clivagem da caspase-1, pode promover uma resposta robusta antiviral mediada por linfócitos TCD8 (Bonilla et al., 2012; Y. et al., 2019). Para confirmar essa hipótese, teríamos que ter dosado os níveis de IL-33 e IFN- $\alpha/\beta$  no soro e no baço desses camundongos.

Estratégias de evasão imunológica contribuem para a persistência bem-sucedida de vírus em modelos imunocompetentes, o que pode atrasar a eliminação da célula infectada por tempo suficiente para permitir que o vírus se replique. Como exemplo de vírus, que como mecanismo de escape imunológico se utilizam de regular negativamente a expressão de moléculas MHC-II na superfície de APCs, temos os herpes vírus. Essa

estratégia ajuda na fuga dos herpes vírus do reconhecimento direto de células T CD4 e também para atenuar a imunidade das células T CD8 antivirais e as respostas de anticorpos, evitando a estimulação do subconjunto de células T auxiliares restritas ao MHC-II (Wiertz et al., 2007). Nossos resultados demonstraram que o ZIKV diminuí a expressão de MHC-II em esplenócitos de camundongos selvagens infectados, embora não tenha estudos relacionando a expressão de MHC-II e a infecção por ZIKV na literatura, estudos mais aprofundados e em tempos iniciais de infecção são necessários para comprovar que esse efeito seria um novo mecanismo de escape da resposta imune induzido pelo ZIKV.

Em contrapartida, Glasner e colaboradores demonstraram que o ZIKV induz uma supra ativação das moléculas MHC-I como mecanismo de escape da detecção de células NK (Glasner et al., 2017b). As células NK são linfócitos inatos que reconhecem e eliminam vários patógenos e são conhecidas principalmente por seu papel no controle de infecções virais (Lam and Lanier, 2017). As células NK expressam receptores inibitórios e ativadores e matam ou poupam seus alvos com base na integração de sinais inibitórios e ativadores. Um desses sinais é a apresentação de antígenos via molécula CD1d, que ativam a resposta de células NK (Brigl and Brenner, 2004). Embora nossos dados não tenham mostrado diferenças nos níveis de expressão de CD1d nos esplenócitos dos camundongos imunocompetentes, mais estudos são necessários para confirmar se a apresentação de antígenos via CD1d não poderia ser mais um mecanismo de escape da resposta imune induzida pelo ZIKV.

O ZIKV também exerce um papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico como foi demonstrado por Chen e colaboradores, a infecção por ZIKV reprograma o perfil lipídico da placenta prejudicando as vias de lipogênese. Essas alterações metabólicas induzidas por ZIKV favorecem a biogênese de corpúsculos lipídicos e rearranjos da membrana intracelular para apoiar replicação viral. Além disso, a reprogramação de lipídio pelo ZIKV é paralela à disfunção mitocondrial e à produção de mediadores lipídicos inflamatórios que promovem um desequilíbrio imunológico inflamatório, que contribuem para os danos na placenta causados pela infecção por ZIKV (Chen et al., 2020), assim como Cheng, nossos resultados demonstraram que a infecção por ZIKV induz um aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos nos esplenócitos dos camundongos selvagens infectados por ZIKV. Sabemos que os corpúsculos lipídicos (CL) são organelas altamente dinâmicas que regulam o metabolismo lipídico (Olzmann and Carvalho, 2019) e muitos vírus de RNA, inclusive membros da família Flaviviridae, HCV e DENV, manipulam a biogênese de CL para favorecer a replicação do genoma viral e a produção de vírions (Miyazaki et al., 2007; Samsa et al., 2009).

O tropismo do ZIKV pelo cérebro, nos levou a investigar se, mesmo em camundongos adultos e imunocompetentes, a infecção por ZIKV levaria a algum dano nesse tecido. Embora diversos estudos tenham demonstrado que o ZIKV infecta células progenitoras neurais, causando a morte dessas células e conseqüentemente um atrofiamento do cérebro, levando a microcefalia em camundongos (Cugola et al., 2016; Dang et al., 2016; Tang et al., 2016), nessa tese, trouxemos uma avaliação do cérebro de

camundongos adultos selvagens imunocompetentes e nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11. Apesar de não termos encontrado alterações no peso, tamanho, carga viral, modulação de citocinas e danos histopatológicos no cérebro após 14 dias de infecção, alguns estudos com esses modelos trouxeram descobertas relevantes para a patogênese do ZIKV.

Figueiredo e colaboradores demonstraram que o ZIKV infecta cérebros de camundongos adultos. Os camundongos infectados exibiam acentuado comprometimento da memória que persistia mesmo após a infecção ter sido combatida pelo organismo. Além disso, isso era consistente com o fato de que as regiões do cérebro responsáveis pelo aprendizado e processamento da memória eram os principais locais de replicação viral em seus cérebros. O trabalho mostrou ainda que a infecção pelo ZIKV causa uma forte resposta inflamatória no cérebro do camundongo, e isso inclui ativação aberrante de TNF- $\alpha$ , microglias e proteínas do sistema complemento. As micróglias ativadas engolfam as sinapses e isso prejudica a comunicação entre os neurônios e, portanto, a formação de novas memórias. Essas descobertas estabelecem um mecanismo pelo qual o ZIKV afeta o cérebro adulto e apontam para a necessidade de avaliar déficits cognitivos como uma comorbidade potencial em pessoas infectadas por ZIKV adultos (Figueiredo et al., 2019).

Outro estudo com camundongos selvagens imunocompetentes demonstrou que uma infecção intracranial por ZIKV levou ao desenvolvimento de uma encefalite letal, na qual o SNC é suscetível à infecção e responde ao ZIKV iniciando uma resposta imune antiviral mediada pelo aumento da expressão de IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IFN- $\gamma$ . Esta resposta é dominada por microglias residentes e monócitos emacrófagos infiltrantes e células NK (Hayashida et al., 2019). Os estudos de Hayashida e Figueiredo reforçam a importância de se estudar os efeitos da infecção do ZIKV em camundongos adultos imunocompetentes.

Embora He e colaboradores tenham usado modelos neonatos, eles demonstraram que a infecção por ZIKV nos camundongos selvagens imunocompetentes neonatos leva ao atrofiamento cerebral, com infiltração neutrofílica maciça, necrose e interrupção da citoarquitetura normal predominantemente no hipocampo, tálamo e áreas do córtex, indicando inflamação focal grave no cérebro. Além disso, foi identificado que o ZIKV induz piroptose em células progenitoras neurais, e aumento de IL-1 $\beta$  no cérebro, isso tudo dependente da Caspase-1 (He et al., 2020). Ainda que, nossos dados com camundongos adultos selvagens e nocautes para as caspases-1/11 e NLRP3 não tenham trazido diferenças significativas durante essas mesmas análises no cérebro, não descartamos a possibilidade de que a infecção por ZIKV poderia estar modificando algo nesse órgão tão privilegiado pelo ZIKV.

A análise de proteômica do cérebro dos camundongos selvagens infectados ou não por ZIKV nos trouxe resultados interessantes. Proteínas com diversas funções, como transporte de aminoácidos, composição do citoesqueleto celular, componentes da cadeia transportadora de elétrons e fatores de transcrição foram moduladas pela infecção por

ZIKV no cérebro. Dentre as proteínas moduladas, a proteína básica de mielina foi a que mais nos chamou atenção.

A proteína básica de mielina (MBP) é a segunda proteína mais abundante na mielina do sistema nervoso central, é responsável pela adesão das superfícies citosólicas de multicamadas compactas de mielina. Pode interagir com uma série de proteínas polianiónicas, incluindo actina, tubulina,  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, clatrina, e lipídios carregados negativamente. Pode atuar como uma proteína de ligação à actina de membrana, o que pode permitir que ela participe da transmissão de sinais extracelulares para o citoesqueleto em oligodendrócitos e junções estreitas na mielina. Algumas isoformas de tamanho de MBP são transportadas para o núcleo e, portanto, também podem se ligar a polinucleotídeos. Sinais extracelulares recebidos por mielina ou oligodendrócitos cultivados causam mudanças na fosforilação de MBP, sugerindo que MBP também está envolvida na sinalização. Como podemos perceber, essa proteína é utilizada por oligodendrócitos e células de Schwann para diferentes fins (Boggs, 2006).

Nos nossos resultados encontramos que a MBP está com abundância diminuída no cérebro dos camundongos selvagens infectados por ZIKV, quando comparados aos não infectados, já no cérebro dos camundongos  $\text{NLRP3}^{-/-}$  infectados por ZIKV, a MBP está com a abundância aumentada, quando comparada com a abundância nos camundongos não infectados. Um estudo, que analisou o tropismo do ZIKV e interações em culturas de células neurais mielinizantes, demonstrou que as células do SNC, axônios e oligodendrócitos são consideravelmente mais suscetíveis à infecção pelo ZIKV do que as células do SNP (Cumberworth et al., 2017). Já um outro estudo que investigou se o ZIKV afeta o desenvolvimento de células da glia em camundongos neonatos utilizou um anticorpo de MBP como marcador para oligodendrócitos, e demonstrou que o sinal para MBP foi quase imperceptível nas regiões do corpo caloso e do córtex nos cérebros dos camundongos infectados, indicando que a infecção por ZIKV levou a uma perda de oligodendrócitos (Li et al., 2018b).

Assim como a MBP, a granulina também está com abundância diminuída no cérebro dos camundongos selvagens e aumentada no cérebro de camundongos  $\text{NLRP3}$  nocautes infectados com ZIKV quando comparados aos não infectados. A progranulina é um fator secretado e expresso por micróglia e neurônios, que é proteoliticamente processado em peptídeos de granulina. A granulina regula processos relacionados ao envelhecimento no córtex cerebral, como inflamação e sobrevivência neuronal (Zambusi et al., 2020). Um estudo que analisou o transcriptoma de astrócitos infectados por ZIKV identificou que a granulina estava sendo regulada negativa nessas células após a infecção por ZIKV (Sher et al., 2019).

A proteína para saída do ciclo celular e diferenciação neuronal 1 (Cend1) é um modulador específico da linhagem neuronal envolvido na sincronização da saída do ciclo celular e na diferenciação de precursores neuronais. É expresso ao longo de toda a linhagem neuronal, desde as células-tronco neurais progenitoras até os neurônios maduros, e está associado à dinâmica das divisões geradoras de neurônios. Estudos

funcionais mostraram que Cend1 tem um papel crítico durante a neurogênese, promovendo a saída do ciclo celular e a diferenciação neuronal (Gaitanou et al., 2019). Em um importante estudo recente com o objetivo de compreender como o ZIKV afeta as células neuronais, Scaturro e colegas aplicaram uma abordagem integrada em NPCs humanos e a linha celular neuronal SK-N-BE2 para caracterizar as respostas celulares à níveis de proteoma e fosfoproteoma após a infecção viral (Scaturro et al., 2018) e descobriu-se que Cend1 interage especificamente com a NS4B do ZIKV, que foi previamente implicada na inibição do desenvolvimento neuronal (Liang et al., 2016). Curiosamente, o knockdown do Cend1 resultou na inibição da replicação do ZIKV, sugerindo que o Cend1 é um novo alvo terapêutico promissor na infecção pelo vírus Zika (Scaturro et al., 2018), assim como, nossos resultados mostraram que a Cend1 está menos abundante nos camundongos infectados NLRP3<sup>-/-</sup> e mais abundante nos camundongos selvagens.

Nesse trabalho demonstramos que, mesmo após 14 dias de infecção pelo ZIKV, camundongos imunocompetentes selvagens e nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 apresentaram modulações de abundância de proteínas cerebrais de diversas vias e com diferentes funções. Sendo assim, precisamos analisar mais profundamente como essas proteínas estão se relacionando umas com as outras e qual o papel dessas proteínas durante a infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo*, bem como os efeitos dessa modulação nos camundongos infectados.

## 7. Conclusão

Nesta tese concluímos que a infecção por ZIKV em camundongos adultos imunocompetentes induz:

- Uma modulação na  $\beta$ -diversidade da microbiota intestinal;
- Diminuição da abundância relativa dos filos bacterianos Firmicutes e Actinobacterias;
- Aumento da abundância relativa dos filos bacterianos Deferribacteres e Spirochaetes;
- Carga viral abaixo do limite de detecção e modulação de citocinas no cólon;
- Um infiltrado de leucócitos na mucosa e submucosa do cólon.

Analizamos também a patogênese do ZIKV em camundongos adultos selvagens e nocautes para as proteínas NLRP3 e Caspases-1/11 e concluímos que:

- Não foi detectada alteração na carga viral, no peso e na glicemia dos camundongos selvagens e nocautes após a infecção por ZIKV;
- A infecção por ZIKV induz uma diminuição da citocina TNF- $\alpha$  no soro dos camundongos selvagens, e uma diminuição de TNF- $\alpha$  ainda menor no soro dos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>;
- A infecção por ZIKV induz a diminuição da citocina IL-10 no soro dos camundongos selvagens, e a diminuição ainda menor no soro dos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> e Casp1/11<sup>-/-</sup>;
- No baço dos camundongos selvagens infectados há o aumento de peso e tamanho quando comparado com o baço dos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> e Casp1/11<sup>-/-</sup> infectados;
- Não foi detectado modulação de forma diferencial na presença de macrófagos e linfócitos no baço dos camundongos selvagens, porém, houve uma diminuição na quantidade de macrófagos no baço dos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> e aumento de Linfócitos TCD8 no baço dos camundongos nocautes após a infecção por ZIKV;
- A infecção por ZIKV induziu a redução na expressão de MHC-II nos esplenócitos dos camundongos selvagens infectados, enquanto que nos esplenócitos dos camundongos Casp1/11<sup>-/-</sup> houve aumento;
- Houve aumento na biogênese de CL nos esplenócitos dos camundongos selvagens, que foi menor nos camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>;
- No cérebro dos camundongos selvagens e nocautes infectados, o ZIKV não modulou diferencialmente o peso, tamanho, danos histopatológicos e secreção de citocinas;
- Ocorreu uma modulação do perfil proteico cerebral induzida pela infecção por ZIKV nos camundongos selvagens e nocautes.

## 8. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2015). *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2. Elsevier Ed. Ltda.*
- Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., et al. (2019). Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients* 11, 2690. doi:10.3390/nu11112690.
- Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Patel, J., Lamothe, F., et al. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat. Microbiol.* 2, 17037. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.37.
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., et al. (2014). Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science (80-. )*. doi:10.1126/science.1247749.
- Alauzet, C., and Jumas-Bilak, E. (2014). “The Phylum Deferribacteres and the Genus Caldithrix,” in *The Prokaryotes* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 595–611. doi:10.1007/978-3-642-38954-2\_162.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., et al. (2017). *Molecular Biology of the Cell*, eds. J. Wilson and T. Hunt Garland Science doi:10.1201/9781315735368.
- Alera, M. T., Hermann, L., Tac-An, I. A., Klungthong, C., Rutvisuttinunt, W., Manasatienkij, W., et al. (2015). Zika virus infection, philippines, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* doi:10.3201/eid2104.141707.
- Almeida, R. das N., Braz-de-Melo, H. A., Santos, I. de O., Corrêa, R., Kobinger, G. P., and Magalhaes, K. G. (2020). The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology. *Cells*. doi:10.3390/cells9041006.
- Amara, A., and Mercer, J. (2015). Viral apoptotic mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 461–469. doi:10.1038/nrmicro3469.
- Azevedo, R. S. S., de Sousa, J. R., Araujo, M. T. F., Martins Filho, A. J., de Alcantara, B. N., Araujo, F. M. C., et al. (2018). In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Sci. Rep.* 8, 1. doi:10.1038/s41598-017-17765-5.
- Bachiller-Luque, P., Domínguez-Gil González, M., Álvarez-Manzanares, J., Vázquez, A., De Ory, F., and Sánchez-Seco Fariñas, M. P. (2016). First case of imported Zika virus infection in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34, 243–246. doi:10.1016/j.eimc.2016.02.012.
- Barjas-Castro, M. L., Angerami, R. N., Cunha, M. S., Suzuki, A., Nogueira, J. S., Rocco, I. M., et al. (2016). Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion* 56, 1684–1688. doi:10.1111/trf.13681.
- Barrera-Cruz, A., Díaz-Ramos, R. D., López-Morales, A. B., Grajales-Muñiz, C., Viniegra-Osorio, A., Zaldívar-Cervera, J. A., et al. (2016). [Technical guidelines for the prevention,



- diagnosis and treatment of Zika virus infection]. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 54, 211–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26960050>.
- Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S. K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y. P., and Salton, S. R. J. (2011). The extended granin family: Structure, function, and biomedical implications. *Endocr. Rev.* doi:10.1210/er.2010-0027.
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Lavezzo, E., Trevisan, M., Sgarabotto, D., et al. (2016). Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Eurosurveillance* 21. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30316.
- Barzon, L., Percivalle, E., Pacenti, M., Rovida, F., Zavattoni, M., Del Bravo, P., et al. (2018). Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* 66, 1173–1180. doi:10.1093/cid/cix967.
- Bateman, A., and Bennett, H. (1998). Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J. Endocrinol.* 158, 145–151. doi:10.1677/joe.0.1580145.
- Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., Cavlar, T., et al. (2011). Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 765–783. doi:10.1007/s00018-010-0567-4.
- Bäumler, A. J., and Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 535, 85–93. doi:10.1038/nature18849.
- Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Bramley, J. C., Morosky, S., Marques, E. T. D. A., et al. (2016). Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 19, 705–712. doi:10.1016/j.chom.2016.03.008.
- Belkaid, Y., and Hand, T. W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157, 121–141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.
- Berger, A. K., and Mainou, B. A. (2018). Interactions between enteric bacteria and eukaryotic viruses impact the outcome of infection. *Viruses*. doi:10.3390/v10010019.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070.
- Berry, D., Kuzyk, O., Rauch, I., Heider, S., Schwab, C., Hainzl, E., et al. (2015). Intestinal Microbiota Signatures Associated with Inflammation History in Mice Experiencing Recurring Colitis. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01408.
- Berry, D., Schwab, C., Milinovich, G., Reichert, J., Ben Mahfoudh, K., Decker, T., et al. (2012). Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. *ISME J.* 6, 2091–2106. doi:10.1038/ismej.2012.39.
- Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., and Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* 19. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751.

- Bhaskaran, N., Quigley, C., Paw, C., Butala, S., Schneider, E., and Pandiyan, P. (2018). Role of short chain fatty acids in controlling Tregs and immunopathology during mucosal infection. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.01995.
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., and Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig. Liver Dis.* 50, 421–428. doi:10.1016/j.dld.2018.02.012.
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: A multifunctional protein. *Cell. Mol. Life Sci.* doi:10.1007/s00018-006-6094-7.
- Böhmig, G. A., Krieger, P. M., Säemann, M. D., Wenhardt, C., Pohanka, E., and Zlabinger, G. J. (1997). n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids. *Immunology* 92, 234–43. doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00337.x.
- Bonilla, W. V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., et al. (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Science (80- )*. doi:10.1126/science.1215418.
- Bowen, J. R., Quicke, K. M., Maddur, M. S., O’Neal, J. T., McDonald, C. E., Fedorova, N. B., et al. (2017). Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* 13, 1–30. doi:10.1371/journal.ppat.1006164.
- Bradley, M. P., and Nagamine, C. M. (2017). Animal models of Zika virus. *Comp. Med.* 67, 242–252. doi:10.1080/14737159.2017.1304213.
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Nogueira, R. M. R., Damasceno, L., Wakimoto, M., et al. (2016a). Zika virus infection in pregnant women in rio de janeiro. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMoa1602412.
- Brasil, P., Sequeira, P. C., Freitas, A. D. A., Zogbi, H. E., Calvet, G. A., De Souza, R. V., et al. (2016b). Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *Lancet* 387, 1482. doi:10.1016/S0140-6736(16)30058-7.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. eds. (2005). *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology*. Boston, MA: Springer US doi:10.1007/0-387-29298-5.
- Briata, P., Chen, C.-Y., Giovarelli, M., Pasero, M., Trabucchi, M., Ramos, A., et al. (2011). KSRP, many functions for a single protein. *Front. Biosci. (Landmark Ed.* 16, 1787–96. doi:10.2741/3821.
- Brigl, M., and Brenner, M. B. (2004). CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu. Rev. Immunol.* doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608.
- Brooks, R. B., Carlos, M. P., Myers, R. A., White, M. G., Bobo-Lenoci, T., Aplan, D., et al. (2016). Likely Sexual Transmission of Zika Virus from a Man with No Symptoms of Infection — Maryland, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 915–916. doi:10.15585/mmwr.mm6534e2.
- Brüssow, H. (2020). Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microb. Biotechnol.* 13, 423–434. doi:10.1111/1751-7915.13479.

- Brutkiewicz, R. R., Yunes-Medina, L., and Liu, J. (2018). Immune evasion of the CD1d/NKT cell axis. *Curr. Opin. Immunol.* doi:10.1016/j.coi.2018.04.021.
- Buathong, R., Hermann, L., Thaisomboonsuk, B., Rutvisuttinunt, W., Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., et al. (2015). Detection of zika virus infection in Thailand, 2012-2014. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* doi:10.4269/ajtmh.15-0022.
- Buckley, A., and Gould, E. A. (1988). Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/0022-1317-69-8-1913.
- Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., et al. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature.* doi:10.1038/nature10429.
- Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M. R., and Marty, A. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.230362997.
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5.
- Camara-Lemarroy, C. R., Metz, L. M., and Yong, V. W. (2018). Focus on the gut-brain axis: Multiple sclerosis, the intestinal barrier and the microbiome. *World J. Gastroenterol.* doi:10.3748/wjg.v24.i37.4217.
- Campos, G., Bandeira, A., and Sardi, S. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1881. doi:10.32301/eid2110.150847.
- Cao-Lormeau, V.-M. (2014). Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1960–1960. doi:10.3201/eid2011.141380.
- Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 387, 1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Cardoso, C. W., Paploski, I. A. D., Kikuti, M., Rodrigues, M. S., Silva, M. M. O., Campos, G. S., et al. (2015). Outbreak of Exanthematous Illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* doi:10.3201/eid2112.151167.
- Carvalho, R. G., Lourenço-De-Oliveira, R., and Braga, I. A. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi:10.1590/0074-0276140304.
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., and Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.1127119.

- Casseb, A. do R., Casseb, L. M. N., Silva, S. P. da, and Vasconcelos, P. F. da C. (2013). ARBOVÍRUS: IMPORTANTE ZOONOSE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. *Veterinária e Zootec.* 20, 9–21.
- Cassel, S. L., Joly, S., and Sutterwala, F. S. (2009). The NLRP3 inflammasome: A sensor of immune danger signals. *Semin. Immunol.* 21, 194–198. doi:10.1016/j.smim.2009.05.002.
- Chaudhary, V., Yuen, K.-S., Chan, J. F.-W., Chan, C.-P., Wang, P.-H., Cai, J.-P., et al. (2017). Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *J. Virol.* 91. doi:10.1128/JVI.00163-17.
- Chen, J. C., Wang, Z., Huang, H., Weitz, S. H., Wang, A., Qiu, X., et al. (2016). Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. *Int. J. Infect. Dis.* 51, 139–140. doi:10.1016/j.ijid.2016.07.015.
- Chen, J., Yang, Y. F., Yang, Y., Zou, P., Chen, J., He, Y., et al. (2018). AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat. Microbiol.* 3, 302–309. doi:10.1038/s41564-017-0092-4.
- Chen, Q., Gouilly, J., Ferrat, Y. J., Espino, A., Glaziou, Q., Cartron, G., et al. (2020). Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat. Commun.* 11. doi:10.1038/s41467-020-16754-z.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., et al. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 46, W486–W494. doi:10.1093/nar/gky310.
- Chow, J., and Mazmanian, S. K. (2010). A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* 7, 265–276. doi:10.1016/j.chom.2010.03.004.
- Coelho, G. E. (2012). Challenges in the control of *Aedes aegypti*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* doi:10.1590/S0036-46652012000700006.
- Cookson, B. T., and Brennan, M. A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 9, 113–114. doi:10.1016/S0966-842X(00)01936-3.
- Couderc, T., Chrétien, F., Schilte, C., Disson, O., Brigitte, M., Guivel-Benhassine, F., et al. (2008). A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog.* 4, e29. doi:10.1371/journal.ppat.0040029.
- Crabtree, M. B., Kinney, R. M., and Miller, B. R. (2005). Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-004-0430-8.
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., et al. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534, 267–271. doi:10.1038/nature18296.
- Cullen, P. A., Haake, D. A., and Adler, B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 291–318. doi:10.1016/j.femsre.2003.10.004.

- Cumberworth, S. L., Barrie, J. A., Cunningham, M. E., de Figueiredo, D. P. G., Schultz, V., Wilder-Smith, A. J., et al. (2017). Zika virus tropism and interactions in myelinating neural cell cultures: CNS cells and myelin are preferentially affected. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 50. doi:10.1186/s40478-017-0450-8.
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., et al. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* 19, 258–265. doi:10.1016/j.stem.2016.04.014.
- Darwish, M. A., Hoogstraal, H., Roberts, T. J., Ahmed, I. P., and Omar, F. (1983). A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 442–445. doi:10.1016/0035-9203(83)90106-2.
- Davidson, A., Slavinski, S., Komoto, K., Rakeman, J., and Weiss, D. (2016). Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 716–717. doi:10.15585/mmwr.mm6528e2.
- de Siqueira, I. C., Rodrigues, S. G., Martins, L. C., Vasilakis, N., Novaes, M. A. C., Alcântara, L. C. J., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 1157–1160. doi:10.4269/ajtmh.16-0306.
- de Sousa, J. R., Azevedo, R. do S. da S., Martins Filho, A. J., de Araujo, M. T. F., Cruz, E. do R. M., Vasconcelos, B. C. B., et al. (2018). In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases. *Cytokine* 111, 255–264. doi:10.1016/j.cyto.2018.08.008.
- Deckard, D. T., Chung, W. M., Brooks, J. T., Smith, J. C., Woldai, S., Hennessey, M., et al. (2016). Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 372–374. doi:10.15585/mmwr.mm6514a3.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. doi:10.1194/jlr.R036012.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- Derraik, J. G., and Slaney, D. (2015). Notes on Zika virus - an emerging pathogen now present in the South Pacific. *Aust. N. Z. J. Public Health* 39, 5–7. doi:10.1111/1753-6405.12302.
- Dick, G. W. . (1953). Paper: Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 47, 13–48. doi:10.1016/0035-9203(53)90021-2.
- Dick, G. W. A. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi:10.1016/0035-9203(52)90042-4.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612.

- Diner, E. J., Burdette, D. L., Wilson, S. C., Monroe, K. M., Kellenberger, C. A., Hyodo, M., et al. (2013). The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. *Cell Rep.* 3, 1355–1361. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.009.
- Ding, Q., Gaska, J. M., Douam, F., Wei, L., Kim, D., Balev, M., et al. (2018). Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1803406115.
- Dowall, S. D., Graham, V. A., and Hewson, R. (2020). Lineage-dependent differences of Zika virus infection in a susceptible mouse model are associated with different profiles of cytokines, chemokines, growth factors and acute phase proteins. *Cytokine* 125, 154864. doi:10.1016/j.cyto.2019.154864.
- Drazic, A., Aksnes, H., Marie, M., Boczkowska, M., Varland, S., Timmerman, E., et al. (2018). NAA80 is actin's N-terminal acetyltransferase and regulates cytoskeleton assembly and cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1718336115.
- Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMoa0805715.
- Edeling, M. A., Diamond, M. S., and Fremont, D. H. (2014). Structural basis of flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1322036111.
- Eichele, D. D., and Kharbanda, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* doi:10.3748/wjg.v23.i33.6016.
- Ellerbroek, S. M., Wennerberg, K., Arthur, W. T., Dunty, J. M., Bowman, D. R., DeMali, K. A., et al. (2004). SGEF, a RhoG guanine nucleotide exchange factor that stimulates macropinocytosis. *Mol. Biol. Cell.* doi:10.1091/mbc.E04-02-0146.
- Elong Ngono, A., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., et al. (2017). Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe* 21, 35–46. doi:10.1016/j.chom.2016.12.010.
- Elong Ngono, A., Young, M. P., Bunz, M., Xu, Z., Hattakam, S., Vizcarra, E., et al. (2019). CD4+ T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. *PLOS Pathog.* 15, e1007474. doi:10.1371/journal.ppat.1007474.
- Erickson, A. K., Jesudhasan, P. R., Mayer, M. J., Narbad, A., Winter, S. E., and Pfeiffer, J. K. (2018). Bacteria Facilitate Enteric Virus Co-infection of Mammalian Cells and Promote Genetic Recombination. *Cell Host Microbe* 23, 77-88.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.11.007.
- Esser-Nobis, K., Aarreberg, L. D., Roby, J. A., Fairgrieve, M. R., Green, R., and Gale, M. (2019). Comparative Analysis of African and Asian Lineage-Derived Zika Virus Strains Reveals Differences in Activation of and Sensitivity to Antiviral Innate Immunity. *J. Virol.* doi:10.1128/jvi.00640-19.
- Fairn, G. D., Schieber, N. L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R. I., et al. (2011).

- High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J. Cell Biol.* 194, 257–275. doi:10.1083/jcb.201012028.
- Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E. M., Zhao, J., Magnuson, T. R., Woodcock, C. L., et al. (2003). H1 Linker Histones Are Essential for Mouse Development and Affect Nucleosome Spacing In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/mcb.23.13.4559-4572.2003.
- Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., et al. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2636. doi:10.1371/journal.pntd.0002636.
- Feldman, A. T., and Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol. Biol.* 1180, 31–43. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2\_3.
- Fernanda Estofolete, C., Terzian, A. C. B., Parreira, R., Esteves, A., Hardman, L., Greque, G. V., et al. (2016). Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: A case series. *J. Clin. Virol.* doi:10.1016/j.jcv.2016.05.012.
- Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M., and Amara, A. (2009). Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* 5, 318–328. doi:10.1016/j.chom.2009.04.001.
- Figueiredo, C. P., Barros-Aragão, F. G. Q., Neris, R. L. S., Frost, P. S., Soares, C., Souza, I. N. O., et al. (2019). Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat. Commun.* 10, 3890. doi:10.1038/s41467-019-11866-7.
- Filipe, A. R., Martins, C. M. V., and Rocha, H. (1973). Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Arch. Gesamte Virusforsch.* doi:10.1007/BF01556147.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes.* doi:10.4161/gmic.19897.
- Fonseca, K., Meatherall, B., Zarra, D., Drebot, M., MacDonald, J., Pabbaraju, K., et al. (2014). Case report: First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* doi:10.4269/ajtmh.14-0151.
- Foo, S.-S., Chen, W., Chan, Y., Bowman, J. W., Chang, L.-C., Choi, Y., et al. (2017). Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat. Microbiol.* 2, 1558–1570. doi:10.1038/s41564-017-0016-3.
- Foster, J. A., and McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/j.tins.2013.01.005.
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A. D., et al. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 880–882. doi:10.3201/eid1705.101939.
- Fredericksen, B. L., Keller, B. C., Fornek, J., Katze, M. G., and Gale, M. (2008). Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1. *J. Virol.* doi:10.1128/jvi.01305-07.
- Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., et al.

- (2016). The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. *Virology* 493, 217–226. doi:10.1016/j.virol.2016.03.006.
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H., and Hattori, M. (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes* 3, 449–454. doi:10.4161/gmic.21214.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294. doi:10.1038/nrgastro.2012.32.
- Gack, M. U., and Diamond, M. S. (2016). Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses. *Curr. Opin. Virol.* doi:10.1016/j.coviro.2016.09.013.
- Gaitanou, M., Segkalia, K., and Matsas, R. (2019). CEND1, a story with many tales: From regulation of cell cycle progression/exit of neural stem cells to brain structure and function. *Stem Cells Int.* doi:10.1155/2019/2054783.
- García-Bujalance, S., Gutiérrez-Arroyo, A., De la Calle, F., Díaz-Menéndez, M., Arribas, J. R., García-Rodríguez, J., et al. (2017). Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: Report of 5 cases. *J. Clin. Virol.* 96, 110–115. doi:10.1016/j.jcv.2017.10.006.
- García-Domingo, D., Ramírez, D., González de Buitrago, G., and Martínez-A, C. (2003). Death inducer-obliterator 1 triggers apoptosis after nuclear translocation and caspase upregulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3216–25. doi:10.1128/mcb.23.9.3216-3225.2003.
- García-Vallejo, J. J., Ambrosini, M., Overbeek, A., van Riel, W. E., Bloem, K., Unger, W. W. J., et al. (2013). Multivalent glycopeptide dendrimers for the targeted delivery of antigens to dendritic cells. *Mol. Immunol.* 53, 387–397. doi:10.1016/j.molimm.2012.09.012.
- Garcia, M., Wehbe, M., Lévêque, N., and Bodet, C. (2017). Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur. Cytokine Netw.* doi:10.1684/ecn.2017.0394.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H. M., de Coppet, P., Buisine, M. P., Aubert, J. P., et al. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 287, G1168–G1174. doi:10.1152/ajpgi.00219.2004.
- Giacani, L., and Lukehart, S. A. (2014). The Endemic Treponematoses. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 89–115. doi:10.1128/CMR.00070-13.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* doi:10.3389/fncel.2013.00045.
- Glasner, A., Oiknine-Djian, E., Weisblum, Y., Diab, M., Panet, A., Wolf, D. G., et al. (2017a). Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J. Virol.* doi:10.1128/jvi.00785-17.
- Glasner, A., Oiknine-Djian, E., Weisblum, Y., Diab, M., Panet, A., Wolf, D. G., et al. (2017b). Zika virus escapes NK cell detection by upregulating MHC class I molecules. *J. Virol.*, JVI.00785-17. doi:10.1128/JVI.00785-17.



- Glover, K., and Coombs, K. M. (2020). ZIKV Infection Induces DNA Damage Response and Alters the Proteome of Gastrointestinal Cells. *Viruses* 12, 771. doi:10.3390/v12070771.
- Godoy, A. S., Lima, G. M. A., Oliveira, K. I. Z., Torres, N. U., Maluf, F. V., Guido, R. V. C., et al. (2017). Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms14764.
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., et al. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell* 158, 250–262. doi:10.1016/j.cell.2014.06.037.
- Gooley, A. & Packer, N. (1997). *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri978.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., et al. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* 540, 438–442. doi:10.1038/nature20556.
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., et al. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 19, 882–890. doi:10.1016/j.chom.2016.05.009.
- Greene, A. C., Patel, B. K. C., and Sheehy, A. J. (1997). *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Manganese- and Iron-Reducing Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 505–509. doi:10.1099/00207713-47-2-505.
- Gregory, C. J., Oduyebo, T., Brault, A. C., Brooks, J. T., Chung, K.-W., Hills, S., et al. (2017). Modes of Transmission of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* 216, S875–S883. doi:10.1093/infdis/jix396.
- Guedes, D. R. D., Paiva, M. H. S., Donato, M. M. A., Barbosa, P. P., Krokovsky, L., Rocha, S. W. dos S., et al. (2017). Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg. Microbes Infect.* 6, 1–11. doi:10.1038/emi.2017.59.
- Guo, H. Y., Zhang, X. C., and Jia, R. Y. (2018). Toll-like receptors and RIG-I-like receptors play important roles in resisting flavivirus. *J. Immunol. Res.* doi:10.1155/2018/6106582.
- Hackett, B. A., and Cherry, S. (2018). Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1720032115.
- Halpain, S., and Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* doi:10.1186/gb-2006-7-6-224.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896. doi:10.1128/JVI.00354-15.
- Han, Q., Robinson, H., Cai, T., Tagle, D. A., and Li, J. (2011). Biochemical and structural characterization of mouse mitochondrial aspartate aminotransferase, a newly identified kynurenine aminotransferase-IV. *Biosci. Rep.* 31, 323–332. doi:10.1042/BSR20100117.

- Harrison, S. C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology* 479–480, 498–507. doi:10.1016/j.virol.2015.03.043.
- Hasan, S. S., Miller, A., Sapparapu, G., Fernandez, E., Klose, T., Long, F., et al. (2017). A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nat. Commun.* 8, 14722. doi:10.1038/ncomms14722.
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 13–20. doi:10.1038/s41594-017-0010-8.
- Hashemi, H. F., and Goodman, J. M. (2015). The life cycle of lipid droplets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 119–124. doi:10.1016/j.ceb.2015.02.002.
- Hashimoto, M., Im, S. J., Araki, K., and Ahmed, R. (2019). Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a028464. doi:10.1101/cshperspect.a028464.
- Hassert, M., Wolf, K. J., Schwetye, K. E., DiPaolo, R. J., Brien, J. D., and Pinto, A. K. (2018). CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1007237.
- Hayashida, E., Ling, Z. L., Ashhurst, T. M., Viengkhou, B., Jung, S. R., Songkhunawej, P., et al. (2019). Zika virus encephalitis in immunocompetent mice is dominated by innate immune cells and does not require T or B cells. *J. Neuroinflammation* 16, 1–15. doi:10.1186/s12974-019-1566-5.
- He, Z., An, S., Chen, J., Zhang, S., Tan, C., Yu, J., et al. (2020). Neural progenitor cell pyroptosis contributes to Zika virus-induced brain atrophy and represents a therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 202007773. doi:10.1073/pnas.2007773117.
- He, Z., Chen, J., Zhu, X., An, S., Dong, X., Yu, J., et al. (2018). NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus–Associated Inflammation. *J. Infect. Dis.* doi:10.1093/infdis/jiy129.
- Hein, M. Y., Sharma, K., Cox, J., and Mann, M. (2013). “Proteomic Analysis of Cellular Systems,” in *Handbook of Systems Biology* (Elsevier), 3–25. doi:10.1016/B978-0-12-385944-0.00001-0.
- Heinz, F. X., and Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* doi:10.1016/j.jcv.2012.08.024.
- Hennessey, M., Fischer, M., and Staples, J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *Am. J. Transplant.* doi:10.1111/ajt.13743.
- Hernandez, M. E., Becerril, E., Perez, M., Leff, P., Anton, B., Estrada, S., et al. (2010). Proinflammatory cytokine levels in fibromyalgia patients are independent of body mass index. *BMC Res. Notes* 3. doi:10.1186/1756-0500-3-156.
- Hirsch, A. J., Roberts, V. H. J., Grigsby, P. L., Haese, N., Schabel, M. C., Wang, X., et al. (2018). Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat. Commun.* 9. doi:10.1038/s41467-017-02499-9.

- Hooper, L. V., Littman, D. R., and Macpherson, A. J. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* (80-. ). 336, 1268–1273. doi:10.1126/science.1223490.
- Hopfner, K.-P., and Hornung, V. (2020). Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 501–521. doi:10.1038/s41580-020-0244-x.
- Horowitz, A., Stegmann, K. A., and Riley, E. M. (2012). Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2011.00088.
- Huang, H., Li, S., Zhang, Y., Han, X., Jia, B., Liu, H., et al. (2017). CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. *J. Virol.* 91, 1–15. doi:10.1128/JVI.00900-17.
- Huh, Y. H., Jeon, S. H., and Yoo, S. H. (2003). Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: Comparison with the similar role of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M304942200.
- Ichinohe, T., Lee, H. K., Ogura, Y., Flavell, R., and Iwasaki, A. (2009). Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J. Exp. Med.* doi:10.1084/jem.20081667.
- Ivashkiv, L. B., and Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri3581.
- Jarchum, I., and Pamer, E. G. (2011). Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Curr. Opin. Immunol.* doi:10.1016/j.coi.2011.03.001.
- Javed, F., Manzoor, K. N., Ali, M., Haq, I. U., Khan, A. A., Zaib, A., et al. (2018). Zika virus: what we need to know? *J. Basic Microbiol.* 58, 3–16. doi:10.1002/jobm.201700398.
- Jemielity, S., Wang, J. J., Chan, Y. K., Ahmed, A. A., Li, W., Monahan, S., et al. (2013). TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1003232.
- Jia, H., Halilou, A. I., Hu, L., Cai, W., Liu, J., and Huang, B. (2011). Heat shock protein 10 (Hsp10) in immune-related diseases: one coin, two sides. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2, 47–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969171>.
- Jiang, X., Dong, X., Li, S.-H., Zhou, Y.-P., Rayner, S., Xia, H.-M., et al. (2018). Proteomic Analysis of Zika Virus Infected Primary Human Fetal Neural Progenitors Suggests a Role for Doublecortin in the Pathological Consequences of Infection in the Cortex. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01067.
- Jo, E.-K., Kim, J. K., Shin, D.-M., and Sasakawa, C. (2015). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Mol. Immunol.*, 1–12. doi:10.1038/cmi.2015.95.
- Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.0803124105.
- Jurado, K. A., Yockey, L. J., Wong, P. W., Lee, S., Huttner, A. J., and Iwasaki, A. (2018). Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat. Microbiol.* 3,

141–147. doi:10.1038/s41564-017-0060-z.

- Kamada, N., and Núñez, G. (2014). Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.060.
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., and Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 321–35. doi:10.1038/nri3430.
- Kane, M., Case, L. K., Kopaskie, K., Kozlova, A., MacDermid, C., Chervonsky, A. V, et al. (2011). Successful Transmission of a Retrovirus Depends on the Commensal Microbiota. *Science* (80-. ). 334, 245–249. doi:10.1126/science.1210718.
- Karabatsos, N. (1978). Supplement to international catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 369–440. doi:8906098.
- Karst, S. M. (2016). The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro.2015.25.
- Katano, T., Takao, K., Abe, M., Yamazaki, M., Watanabe, M., Miyakawa, T., et al. (2018). Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. *Mol. Brain*. doi:10.1186/s13041-018-0407-2.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. doi:10.1038/nature04734.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., et al. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* doi:10.1038/ni1243.
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., et al. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. doi:10.1038/nature15541.
- Khaiboullina, S. F., Uppal, T., Sarkar, R., Gorzalski, A., St Jeor, S., and Verma, S. C. (2017). ZIKV infection regulates inflammasomes pathway for replication in monocytes. *Sci. Rep.* 7, 16050. doi:10.1038/s41598-017-16072-3.
- Kim, D., Zeng, M. Y., and Núñez, G. (2017a). The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Exp. Mol. Med.* doi:10.1038/emm.2017.24.
- Kim, S. Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., et al. (2017b). Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry* 56, 1151–1162. doi:10.1021/acs.biochem.6b01056.
- Kirschner, M. A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Amara, S. G. (1994). Mouse Excitatory Amino Acid Transporter EAAT2: Isolation, Characterization, and Proximity to Neuroexcitability Loci on Mouse Chromosome 2. *Genomics*. doi:10.1006/geno.1994.1609.
- Kleerebezem, M., and Vaughan, E. E. (2009). Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: Molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* doi:10.1146/annurev.micro.091208.073341.

- Knoop, K. A., McDonald, K. G., Kulkarni, D. H., and Newberry, R. D. (2016). Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2014-309059.
- Kowalski, K., and Mulak, A. (2019). Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *J. Neurogastroenterol. Motil.* doi:10.5056/jnm18087.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., et al. (2002). Structure of Dengue Virus. *Cell* 108, 717–725. doi:10.1016/S0092-8674(02)00660-8.
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A. M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., et al. (2016). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.* doi:10.15252/embr.201642627.
- Kuno, G., Chang, G.-J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., and Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J. Virol.* doi:10.1128/jvi.72.1.73-83.1998.
- Kuno, G., and Chang, G. J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-006-0903-z.
- Kuss, S. K., Best, G. T., Etheredge, C. A., Pruijssers, A. J., Frierson, J. M., Hooper, L. V., et al. (2011). Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis. *Science* (80-. ). 334, 249–252. doi:10.1126/science.1211057.
- Kwok, J. C. F., Warren, P., and Fawcett, J. W. (2012). Chondroitin sulfate: A key molecule in the brain matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 582–586. doi:10.1016/j.biocel.2012.01.004.
- Lam, V. C., and Lanier, L. L. (2017). NK cells in host responses to viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 44, 43–51. doi:10.1016/j.coi.2016.11.003.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 137–161. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155745.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007.
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., et al. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1232–1239. doi:10.3201/eid1408.080287.
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., and del Carmen Castillo Signor, L. (2016). Phylogeny of zika virus in western Hemisphere, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 933–935. doi:10.3201/eid2205.160065.
- Lazear, H. M., Govero, J., Smith, A. M., Platt, D. J., Fernandez, E., Miner, J. J., et al. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 19, 720–730. doi:10.1016/j.chom.2016.03.010.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi:10.1016/j.copbio.2012.08.005.

- Lechner, T., Adlassnig, C., Humpel, C., Kaufmann, W. A., Maier, H., Reinstadler-Kramer, K., et al. (2004). Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* doi:10.1016/j.exger.2003.09.018.
- Lei, J., Hansen, G., Nitsche, C., Klein, C. D., Zhang, L., and Hilgenfeld, R. (2016). Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science* (80-. ). 353, 503–505. doi:10.1126/science.aag2419.
- Lemke, G., and Rothlin, C. V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri2303.
- Lenka, N., Vijayasarathy, C., Mullick, J., and Avadhani, N. G. (1998). “Structural Organization and Transcription Regulation of Nuclear Genes Encoding the Mammalian Cytochrome c Oxidase Complex,” in *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 309–344. doi:10.1016/S0079-6603(08)60830-2.
- Lester, S. N., and Li, K. (2014). Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *J. Mol. Biol.* 426, 1246–1264. doi:10.1016/j.jmb.2013.11.024.
- Li, C., Deng, Y.-Q., Zu, S., Quanquin, N., Shang, J., Tian, M., et al. (2018a). Zika virus shedding in the stool and infection through the anorectal mucosa in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 169. doi:10.1038/s41426-018-0170-6.
- Li, C., Wang, Q., Jiang, Y., Ye, Q., Xu, D., Gao, F., et al. (2018b). Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. *Cell Discov.* 4, 43. doi:10.1038/s41421-018-0042-1.
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., et al. (2016). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19, 120–126. doi:10.1016/j.stem.2016.04.017.
- Li, F., Wang, P. R., Qu, L. B., Yi, C. H., Zhang, F. C., Tang, X. P., et al. (2017). AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. *Emerg. Microbes Infect.* doi:10.1038/emi.2017.10.
- Li, N., Ma, W. T., Pang, M., Fan, Q. L., and Hua, J. L. (2019). The commensal microbiota and viral infection: A comprehensive review. *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2019.01551.
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S. S., Lee, S. A., et al. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 19, 663–671. doi:10.1016/j.stem.2016.07.019.
- Lin, J. P., Fan, Y. K., and Liu, H. M. (2019a). The 14-3-3 $\eta$  chaperone protein promotes antiviral innate immunity via facilitating MDA5 oligomerization and intracellular redistribution. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1007582.
- Lin, S., Wang, Z., Lam, K.-L., Zeng, S., Tan, B. K., and Hu, J. (2019b). Role of intestinal microecology in the regulation of energy metabolism by dietary polyphenols and their metabolites. *Food Nutr. Res.* 63, 1–12. doi:10.29219/fnr.v63.1518.
- Lin, S., Yang, S., He, J., Guest, J. D., Ma, Z., Yang, L., et al. (2019c). Zika virus NS5 protein

- antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. *Virology* 527, 180–187. doi:10.1016/j.virol.2018.11.009.
- Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* doi:10.1016/S0065-3527(03)59002-9.
- Liu, H. M., Loo, Y. M., Horner, S. M., Zornetzer, G. A., Katze, M. G., and Gale, M. (2012). The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 $\epsilon$  regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell Host Microbe*. doi:10.1016/j.chom.2012.04.006.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., et al. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*. doi:10.1038/nature18629.
- Liu, Y., Kim, H., Liang, J., Lu, W., Ouyang, B., Liu, D., et al. (2014). The death-inducer obliterator 1 (Dido1) gene regulates embryonic stem cell self-renewal. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M113.486290.
- Louis, P., and Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x.
- Louis, P., and Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 19, 29–41. doi:10.1111/1462-2920.13589.
- Loy, A., Pfann, C., Steinberger, M., Hanson, B., Herp, S., Brugiroux, S., et al. (2017). Lifestyle and Horizontal Gene Transfer-Mediated Evolution of *Mucispirillum schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *mSystems* 2. doi:10.1128/mSystems.00171-16.
- Lucas, C. G. O., Kitoko, J. Z., Ferreira, F. M., Suzart, V. G., Papa, M. P., Coelho, S. V. A., et al. (2018). Critical role of CD4<sup>+</sup> T cells and IFN $\gamma$  signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nat. Commun.* 9, 1–12. doi:10.1038/s41467-018-05519-4.
- Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., et al. (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2, 119–29. doi:10.1016/j.chom.2007.06.010.
- M, H., Azzazy, E., and Christenson, R. H. (1997). All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Theodore Peters, Jr. San Diego, CA: Academic Press, 1996, 432 pp, \$85.00. ISBN 0-12-552110-3. *Clin. Chem.* 43, 2014a – 2015. doi:10.1093/clinchem/43.10.2014a.
- Ma, J., Ketkar, H., Geng, T., Lo, E., Wang, L., Xi, J., et al. (2018). Zika Virus Non-structural Protein 4A Blocks the RLR-MAVS Signaling. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01350.
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., and Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.0305892101.

- Ma, W., Li, S., Ma, S., Jia, L., Zhang, F., Zhang, Y., et al. (2016). Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell* 167, 1511-1524.e10. doi:10.1016/j.cell.2016.11.016.
- Macedo, J. A., Hesse, J., Turner, J. D., Ammerlaan, W., Gierens, A., Hellhammer, D. H., et al. (2007). Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased L-selectin on monocytes and neutrophils. *J. Neuroimmunol.* 188, 159–166. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.06.002.
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K., and Young, P. R. (1996). Immunolocalization of the Dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220, 232–240. doi:10.1006/viro.1996.0307.
- MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139–145. doi:10.1016/0035-9203(54)90006-1.
- Macpherson, A. J., and Uhr, T. (2004a). Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029, 36–43. doi:10.1196/annals.1309.005.
- Macpherson, A. J., and Uhr, T. (2004b). Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science (80-. )*. doi:10.1126/science.1091334.
- Magoro, T., Dandekar, A., Jennelle, L. T., Bajaj, R., Lipkowitz, G., Angelucci, A. R., et al. (2019). IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /IL-6 inflammatory cytokines promote STAT1-dependent induction of CH25H in Zika virus-infected human macrophages. *J. Biol. Chem.* 294, 14591–14602. doi:10.1074/jbc.RA119.007555.
- Malmgaard, L. (2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interf. Cytokine Res.* doi:10.1089/1079990041689665.
- Manangeeswaran, M., Ireland, D. D. C., and Verthelyi, D. (2016). Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. *PLoS Pathog.* 12, 1–20. doi:10.1371/journal.ppat.1006004.
- Manangeeswaran, M., Kielczewski, J. L., Sen, H. N., Xu, B. C., Ireland, D. D. C., McWilliams, I. L., et al. (2018). ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions article. *Emerg. Microbes Infect.* doi:10.1038/s41426-018-0096-z.
- Mann, T. Z., Haddad, L. B., Williams, T. R., Hills, S. L., Read, J. S., Dee, D. L., et al. (2018). Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* doi:10.1111/ppe.12478.
- Mansuy, J. M., Dutertre, M., Mengelle, C., Fourcade, C., Marchou, B., Delobel, P., et al. (2016). Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect. Dis.* 16, 405. doi:10.1016/S1473-3099(16)00138-9.
- Marchette, N. J., Garcia, R., and Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* doi:10.4269/ajtmh.1969.18.411.
- Marcondes, C. B., and Ximenes, M. de F. F. de M. (2016). Zika virus in Brazil and the danger of



- infestation by aedes (*Stegomyia*) mosquitoes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* doi:10.1590/0037-8682-0220-2015.
- Martínez, L. E., Garcia, G., Contreras, D., Gong, D., Sun, R., and Arumugaswami, V. (2020). Zika Virus Mucosal Infection Provides Protective Immunity. *J. Virol.* 94. doi:10.1128/JVI.00067-20.
- Martins, A. S., Martins, I. C., and Santos, N. C. (2018). Methods for lipid droplet biophysical characterization in flaviviridae infections. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.01951.
- Matangkasombut, P., Chan-in, W., Opasawaschai, A., Pongchaikul, P., Tangthawornchaikul, N., Vasanawathana, S., et al. (2014). Invariant NKT Cell Response to Dengue Virus Infection in Human. *PLoS Negl. Trop. Dis.* doi:10.1371/journal.pntd.0002955.
- McCarthy, M. (2016). First US case of Zika virus infection is identified in Texas. *BMJ*, i212. doi:10.1136/bmj.i212.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., et al. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* 18, 324–333. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.045.
- Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 803–833. doi:10.1146/annurev-biochem-060208-104626.
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., et al. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* 45, D183–D189. doi:10.1093/nar/gkw1138.
- Mi, H., Muruganujan, A., and Thomas, P. D. (2013). PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gks1118.
- Miao, E. A., Rajan, J. V., and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243, 206–14. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x.
- Michlmayr, D., Andrade, P., Gonzalez, K., Balmaseda, A., and Harris, E. (2017). CD14+CD16+monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat. Microbiol.* 2, 1462–1470. doi:10.1038/s41564-017-0035-0.
- Miklossy, J. (2015). Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnagi.2015.00046.
- Miller, T. L., and Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1589–1592. doi:10.1128/AEM.62.5.1589-1592.1996.
- Miner, J. J., Cao, B., Govero, J., Smith, A. M., Fernandez, E., Cabrera, O. H., et al. (2016a). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*

- 165, 1081–1091. doi:10.1016/j.cell.2016.05.008.
- Miner, J. J., and Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* 21, 134–142. doi:10.1016/j.chom.2017.01.004.
- Miner, J. J., Sene, A., Richner, J. M., Smith, A. M., Santeford, A., Ban, N., et al. (2016b). Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Rep.* 16, 3208–3218. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.079.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., et al. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb1631.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., et al. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 374, 951–958. doi:10.1056/NEJMoa1600651.
- Mudunuri, U., Che, A., Yi, M., and Stephens, R. M. (2009). bioDBnet: The biological database network. *Bioinformatics.* doi:10.1093/bioinformatics/btn654.
- Mulak, A., and Bonaz, B. (2015). Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J. Gastroenterol.* doi:10.3748/wjg.v21.i37.10609.
- Mulvihill, E., Sborgi, L., Mari, S. A., Pfreundschuh, M., Hiller, S., and Müller, D. J. (2018). Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *EMBO J.* 37. doi:10.15252/embj.201798321.
- Murphy, K. (2014). *Imunobiologia de Janeway.*
- Murray, K. O., Gorchakov, R., Carlson, A. R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., et al. (2017). Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 99–101. doi:10.3201/eid2301.161394.
- Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
- Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri3073.
- Musso, D. (2015). Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1887–1889. doi:10.3201/eid2110.151125.
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., et al. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* 19, 20761. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V. M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus.[Erratum appears in Emerg Infect Dis. 2015 Mar;21(3):552]. *Emerg Infect Dis.* doi:http://dx.doi.org/10.3201/eid2102.141363.
- Nasirudeen, A. M. A., Wong, H. H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.-P., and Liu, D. X. (2011). RIG-I,

- MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e926. doi:10.1371/journal.pntd.0000926.
- Naveca, F. G., Pontes, G. S., Chang, A. Y. H., da Silva, G. A. V., do Nascimento, V. A., Monteiro, D. C. da S., et al. (2018). Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi:10.1590/0074-02760170542.
- Nazerai, L., Schøller, A. S., Rasmussen, P. O. S., Buus, S., Stryhn, A., Christensen, J. P., et al. (2018). A new in vivo model to study protective immunity to Zika virus infection in mice with intact type I interferon signaling. *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2018.00593.
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., and Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 125–142. doi:10.1038/nrmicro.2017.170.
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., and Kriegstein, A. R. (2016). Expression analysis highlights AXL as a candidate zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 18, 591–596. doi:10.1016/j.stem.2016.03.012.
- Nuding, S., Antoni, L., and Stange, E. F. (2013). The host and the flora. *Dig. Dis.* 31, 286–92. doi:10.1159/000354680.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparç-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., et al. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* 19. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* doi:10.1016/0016-5085(90)90290-H.
- Oliveira Melo, A. S., Malinge, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., and Bispo De Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* doi:10.1002/uog.15831.
- Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, G., and Triwibowo, V. (1981). Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi:10.1016/0035-9203(81)90100-0.
- Olzmann, J. A., and Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/s41580-018-0085-z.
- Onorati, M., Li, Z., Liu, F., Sousa, A. M. M., Nakagawa, N., Li, M., et al. (2016). Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Rep.* doi:10.1016/j.celrep.2016.08.038.
- Österlund, P., Jiang, M., Westenius, V., Kuivanen, S., Järvi, R., Kakkola, L., et al. (2019). Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. *Sci. Rep.* 9, 15710. doi:10.1038/s41598-019-52307-1.
- Pan American Health Organisation (2015). Neurological syndrome, congenital malformations,

- and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. *Pan Am. Heal. Organ.*, 1–11. Available at: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en).
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., et al. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00277.
- Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, S. M., and Richer, M. J. (2017). Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLOS Pathog.* 13, e1006184. doi:10.1371/journal.ppat.1006184.
- Peng, L., Li, Z.-R., Green, R. S., Holzman, I. R., and Lin, J. (2009). Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J. Nutr.* 139, 1619–1625. doi:10.3945/jn.109.104638.
- Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, A., Bratic, A., García-Bartolomé, A., et al. (2016). COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Rep.* doi:10.1016/j.celrep.2016.07.081.
- Persaud, M., Martinez-Lopez, A., Buffone, C., Porcelli, S. A., and Diaz-Griffero, F. (2018). Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology* 518, 301–312. doi:10.1016/j.virol.2018.03.009.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., and Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 1552–1563. doi:10.1056/NEJMra1602113.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14, 1583–1589. doi:10.1038/sj.cdd.4402195.
- Phoo, W. W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M. Y., Loh, Y. R., Tan, Y. B., et al. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat. Commun.* 7, 13410. doi:10.1038/ncomms13410.
- Prisant, N., Bujan, L., Benichou, H., Hayot, P.-H., Pavili, L., Lurel, S., et al. (2016). Zika virus in the female genital tract. *Lancet Infect. Dis.* 16, 1000–1001. doi:10.1016/S1473-3099(16)30193-1.
- Pryor, M. J., and Wright, P. J. (1994). Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/0022-1317-75-5-1183.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Article: Nature. *Nature* 464, 59–65. doi:10.1038/nature08821.
- Quicke, K. M., Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O’Neal, J. T., et al. (2016).

- Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* 20, 83–90. doi:10.1016/j.chom.2016.05.015.
- Rabelo, K., Souza, L. J., Salomão, N. G., Oliveira, E. R. A., Sentinelli, L. de P., Lacerda, M. S., et al. (2018). Placental inflammation and fetal injury in a rare Zika case associated with Guillain-Barré Syndrome and abortion. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.01018.
- Randell, S. H., Broers, J. L. V., and Ramaekers, F. C. S. (2006). “Keratin,” in *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set* doi:10.1016/B0-12-370879-6/00206-4.
- Rao, M., and Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: The enteric nervous system in neurological disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* doi:10.1038/nrgastro.2016.107.
- Reichenbach, B., Classon, J., Aida, T., Tanaka, K., Genander, M., and Göritz, C. (2018). Glutamate transporter Slc1a3 mediates inter-niche stem cell activation during skin growth. *EMBO J.* doi:10.15252/embj.201798280.
- Reikine, S., Nguyen, J. B., and Modis, Y. (2014). Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2014.00342.
- Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., et al. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422, 888–893. doi:10.1038/nature01597.
- Renneson, J., Guabiraba, R., Maillet, I., Marques, R. E., Ivanov, S., Fontaine, J., et al. (2011). A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. *Am. J. Pathol.* doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.023.
- Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* doi:10.1016/j.it.2011.04.003.
- Retallack, H., Di Lullo, E., Arias, C., Knopp, K. A., Laurie, M. T., Sandoval-Espinosa, C., et al. (2016). Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 14408–14413. doi:10.1073/pnas.1618029113.
- Riedl, W., Acharya, D., Lee, J.-H., Liu, G., Serman, T., Chiang, C., et al. (2019). Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host Microbe* 26, 493-503.e6. doi:10.1016/j.chom.2019.09.012.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., et al. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14. doi:10.3390/microorganisms7010014.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G., and Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2016.00185.
- Robertson, B. R., O’Rourke, J. L., Neilan, B. A., Vandamme, P., On, S. L. W., Fox, J. G., et al. (2005). *Mucispirillum schaedleri* gen. nov., sp. nov., a spiral-shaped bacterium colonizing the mucus layer of the gastrointestinal tract of laboratory rodents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1199–1204. doi:10.1099/ijs.0.63472-0.

- Roche, P. A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri3818.
- Rodrigues de Sousa, J., Azevedo, R. do S. da S., Quaresma, J. A. S., and Vasconcelos, P. F. da C. (2020). The innate immune response in Zika virus infection. *Rev. Med. Virol.* doi:10.1002/rmv.2166.
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* 26. doi:10.3402/mehd.v26.26050.
- Rossi, S. L., Tesh, R. B., Azar, S. R., Muruato, A. E., Hanley, K. A., Auguste, A. J., et al. (2016). Characterization of a novel murine model to study zika virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* doi:10.4269/ajtmh.16-0111.
- Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–323. doi:10.1038/nri2515.
- Russell, K., Hills, S. L., Oster, A. M., Porse, C. C., Danyluk, G., Cone, M., et al. (2017). Male-to-Female Sexual Transmission of Zika Virus—United States, January–April 2016. *Clin. Infect. Dis.* 64, 211–213. doi:10.1093/cid/ciw692.
- Sakai, K., Hirai, M., Kudoh, J., Minoshima, S., and Shimizu, N. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of a cDNA encoding human 80K-L protein: Major substrate for protein kinase C. *Genomics.* doi:10.1016/S0888-7543(05)80301-5.
- Salvador, F. S., and Fujita, D. M. (2016). Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Med. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.tmaid.2015.10.004.
- Salzman, N. H., Ghosh, D., Huttner, K. M., Paterson, Y., and Bevins, C. L. (2003). Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature.* doi:10.1038/nature01520.
- Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., et al. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1000632.
- Sanders, M. C., Goldstein, A. L., and Wang, Y. L. (1992). Thymosin  $\beta$ 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.89.10.4678.
- Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D., and Snyder, S. H. (1997). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.94.21.11669.
- Scaturro, P., Kastner, A. L., and Pichlmair, A. (2019). Chasing intracellular Zika virus using proteomics. *Viruses* 11. doi:10.3390/v11090878.
- Scaturro, P., Stukalov, A., Haas, D. A., Cortese, M., Draganova, K., Płaszczycyca, A., et al. (2018). An orthogonal proteomic survey uncovers novel Zika virus host factors. *Nature.* doi:10.1038/s41586-018-0484-5.

- Schenkman, J. B., and Jansson, I. (2003). The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.* 97, 139–152. doi:10.1016/S0163-7258(02)00327-3.
- Schiavo, G., Greensmith, L., Hafezparast, M., and Fisher, E. M. C. (2013). Cytoplasmic dynein heavy chain: The servant of many masters. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/j.tins.2013.08.001.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., and Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040.
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., et al. (2016). Possível associação entre a infecção pelo vírus zika e a microcefalia — Brasil, 2015. *Weekly* 65, 59–62. doi:10.15585/mmwr.mm6503e2.
- Schwartz, D. A. (2017). Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. *Arch. Gynecol. Obstet.* doi:10.1007/s00404-017-4361-5.
- Scott, K. P., Martin, J. C., Duncan, S. H., and Flint, H. J. (2014). Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 30–40. doi:10.1111/1574-6941.12186.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14, e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- Serman, T. M., and Gack, M. U. (2019). Evasion of innate and intrinsic antiviral pathways by the Zika Virus. *Viruses* 11. doi:10.3390/v111100970.
- Šestan, M., Marinović, S., Kavazović, I., Cekinović, Đ., Wueest, S., Turk Wensveen, T., et al. (2018). Virus-Induced Interferon- $\gamma$  Causes Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Derails Glycemic Control in Obesity. *Immunity* 49, 164-177.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.05.005.
- Seth, R. B., Sun, L., and Chen, Z. J. (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* 16, 141–147. doi:10.1038/sj.cr.7310019.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2005.08.012.
- Shen, Z.-H., Zhu, C.-X., Quan, Y.-S., Yang, Z.-Y., Wu, S., Luo, W.-W., et al. (2018). Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 24, 5–14. doi:10.3748/wjg.v24.i1.5.
- Sher, A. A., Glover, K. K. M., and Coombs, K. M. (2019). Zika virus infection disrupts astrocytic proteins involved in synapse control and axon guidance. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2019.00596.

- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., et al. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. doi:10.1038/nature15514.
- Shi, Y., and Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem. Sci.* xx, 1–14. doi:10.1016/j.tibs.2017.02.009.
- Shrivastava, G., León-Juárez, M., García-Cordero, J., Meza-Sánchez, D. E., and Cedillo-Barrón, L. (2016). Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunol. Res.* doi:10.1007/s12026-016-8873-z.
- Siddique, R., Liu, Y., Nabi, G., Sajjad, W., Xue, M., and Khan, S. (2019). Zika Virus Potentiates the Development of Neurological Defects and Microcephaly: Challenges and Control Strategies. *Front. Neurol.* 10. doi:10.3389/fneur.2019.00319.
- Slavov, S., Matsuno, A., Yamamoto, A., Otaguri, K., Cervi, M., Covas, D., et al. (2018). Zika virus infection in a pediatric patient with acute gastrointestinal involvement. *Pediatr. Rep.* 9. doi:10.4081/pr.2017.7341.
- Slavov, S. N., Hespanhol, M. R., Rodrigues, E. S., Levi, J. E., Ubiali, E. M. A., Covas, D. T., et al. (2017). Zika virus RNA detection in asymptomatic blood donors during an outbreak in the northeast region of Sao Paulo State, Brazil, 2016. *Transfusion* 57, 2897–2901. doi:10.1111/trf.14322.
- Smit, J., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., and Wilschut, J. (2011). Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 3, 160–171. doi:10.3390/v3020160.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., et al. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.1241165.
- Smith, P., Siddharth, J., Pearson, R., Holway, N., Shaxted, M., Butler, M., et al. (2012). Host Genetics and Environmental Factors Regulate Ecological Succession of the Mouse Colon Tissue-Associated Microbiota. *PLoS One* 7, e30273. doi:10.1371/journal.pone.0030273.
- SMITHBURN, K. C., KERR, J. A., and GATNE, P. B. (1954a). Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *J. Immunol.* 72, 248–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13163397>.
- SMITHBURN, K. C., TAYLOR, R. M., RIZK, F., and KADER, A. (1954b). Immunity to certain arthropod-borne viruses among indigenous residents of Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* doi:10.4269/ajtmh.1954.3.9.
- Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., and Gao, G. F. (2016). Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* doi:10.1038/nsmb.3213.
- Srikantha, P., and Mohajeri, M. H. (2019). The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2115. doi:10.3390/ijms20092115.
- Stefanik, M., Formanova, P., Bily, T., Vancova, M., Eyer, L., Palus, M., et al. (2018). Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neurosci.* 19, 1–8. doi:10.1186/s12868-018-0407-2.



- Steiner, P., Kulangara, K., Sarria, J. C. F., Glauser, L., Regazzi, R., and Hirling, H. (2004). Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J. Neurochem.* 89, 569–580. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02345.x.
- Stetson, D. B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity.* doi:10.1016/j.immuni.2005.12.003.
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., et al. (2016). Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science (80- )*. 353, 823–826. doi:10.1126/science.aaf8505.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278–286. doi:10.1038/nature10759.
- Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M., and Nishihira, J. (1997). Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *J. Struct. Biol.* doi:10.1006/jsbi.1997.3904.
- Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M., and Nishihira, J. (1999). Crystal structure of human D-Dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry.* doi:10.1021/bi982184o.
- Sun, B., Sundström, K. B., Chew, J. J., Bist, P., Gan, E. S., Tan, H. C., et al. (2017a). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Sci. Rep.* 7, 3594. doi:10.1038/s41598-017-03932-1.
- Sun, J., Wu, D., Zhong, H., Guan, D., Zhang, H., Tan, Q., et al. (2016). Presence of Zika virus in conjunctival fluid. *JAMA Ophthalmol.* doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.3417.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science (80- )*. 339, 786–791. doi:10.1126/science.1232458.
- Sun, X., Hua, S., Chen, H. R., Ouyang, Z., Einkauf, K., Tse, S., et al. (2017b). Transcriptional Changes during Naturally Acquired Zika Virus Infection Render Dendritic Cells Highly Conducive to Viral Replication. *Cell Rep.* 21, 3471–3482. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.087.
- Suthar, M. S., Aguirre, S., and Fernandez-Sesma, A. (2013). Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathog.* 9, 5–8. doi:10.1371/journal.ppat.1003541.
- Sutherland, M. L., Delaney, T. A., and Noebels, J. L. (1995). Molecular characterization of a high-affinity mouse glutamate transporter. *Gene.* doi:10.1016/0378-1119(95)00293-F.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., et al. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 45, D362–D368. doi:10.1093/nar/gkw937.
- Tabata, T., Petitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., et al. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe.* doi:10.1016/j.chom.2016.07.002.

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.276.5319.1699.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., et al. (2016). Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590. doi:10.1016/j.stem.2016.02.016.
- Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-014-9070-5.
- Taniguchi, T., and Takaoka, A. (2002). The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral responses: A multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* doi:10.1016/S0952-7915(01)00305-3.
- Tappe, D., Pérez-Girón, J. V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D. F., Jaenisch, T., et al. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med. Microbiol. Immunol.* 205, 269–273. doi:10.1007/s00430-015-0445-7.
- Tau, G. Z., Cowan, S. N., Weisburg, J., Braunstein, N. S., and Rothman, P. B. (2001). Regulation of IFN- $\gamma$  Signaling Is Essential for the Cytotoxic Activity of CD8 + T Cells . *J. Immunol.* doi:10.4049/jimmunol.167.10.5574.
- Tau, G. Z., von der Weid, T., Lu, B., Cowan, S., Kvatyuk, M., Pernis, A., et al. (2000). Interferon  $\gamma$  Signaling Alters the Function of T Helper Type 1 Cells. *J. Exp. Med.* 192, 977–986. doi:10.1084/jem.192.7.977.
- Terzian, A. C. B., Schanoski, A. S., De Oliveira Mota, M. T., Da Silva, R. A., Estofolete, C. F., Colombo, T. E., et al. (2017). Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 65, 1260–1265. doi:10.1093/cid/cix558.
- Thackray, L. B., Handley, S. A., Gorman, M. J., Poddar, S., Bagadia, P., Briseño, C. G., et al. (2018). Oral Antibiotic Treatment of Mice Exacerbates the Disease Severity of Multiple Flavivirus Infections. *Cell Rep.* 22, 3440-3453.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.001.
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., and Kono, D. H. (2005). Type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843.
- Thomas, P. G., Dash, P., Aldridge, J. R., Ellebedy, A. H., Reynolds, C., Funk, A. J., et al. (2009). The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.006.
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., et al. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-015-2695-5.
- Tricarico, P. M., Caracciolo, I., Crovella, S., and D'Agaro, P. (2017). Zika virus induces

- inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.158.
- Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 210–215. doi:10.1038/nri2725.
- Umetsu, S. E., Lee, W.-L., McIntire, J. J., Downey, L., Sanjanwala, B., Akbari, O., et al. (2005). TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 6, 447–454. doi:10.1038/ni1186.
- Utsunomiya-Tate, N., Endou, H., and Kanai, Y. (1997). Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett.* doi:10.1016/S0014-5793(97)01232-5.
- Van Buul, J. D., Allingham, M. J., Samson, T., Meller, J., Boulter, E., García-Mata, R., et al. (2007). RhoG regulates endothelial apical cup assembly downstream from ICAM1 engagement and is involved in leukocyte trans-endothelial migration. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.200612053.
- Vanwalscappel, B., Tada, T., and Landau, N. R. (2018). Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication by inducing the antiviral protein viperin. *Virology.* doi:10.1016/j.virol.2018.07.014.
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., and Lourenco-de-Oliveira, R. (2014). High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J. Virol.* doi:10.1128/jvi.00370-14.
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., and Curi, R. (2011). Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 3, 858–876. doi:10.3390/nu3100858.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* doi:10.1038/ni1582.
- Wallace, D. J., Linker-Israeli, M., Hallegua, D., Silverman, S., Silver, D., and Weisman, M. H. (2001). Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology* 40, 743–749. doi:10.1093/rheumatology/40.7.743.
- Walther, T. C., and Farese, R. V. (2012). Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 687–714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430.
- Wang, B., Tan, X. F., Thurmond, S., Zhang, Z. M., Lin, A., Hai, R., et al. (2017a). The structure of Zika virus NS5 reveals a conserved domain conformation. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms14763.
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., and Li, L. (2017b). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 3, 71–82. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.008.
- Wang, H. X., and Wang, Y. P. (2016). Gut microbiota-brain axis. *Chin. Med. J. (Engl.)* doi:10.4103/0366-6999.190667.
- Wang, J., Wang, Y., Zhang, X., Liu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., et al. (2017c). Gut Microbial

- Dysbiosis Is Associated with Altered Hepatic Functions and Serum Metabolites in Chronic Hepatitis B Patients. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02222.
- Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L., et al. (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417, 941–944. doi:10.1038/nature00867.
- Wang, W., Li, G., De, W., Luo, Z., Pan, P., Tian, M., et al. (2018). Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 $\beta$  secretion. *Nat. Commun.* 9. doi:10.1038/s41467-017-02645-3.
- Wang, Z.-Y., Wang, Z., Zhen, Z.-D., Feng, K.-H., Guo, J., Gao, N., et al. (2017d). Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *J. Gen. Virol.* 98, 2061–2068. doi:10.1099/jgv.0.000886.
- Wearsch, P. A., and Cresswell, P. (2008). The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 624–631. doi:10.1016/j.ceb.2008.09.005.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., et al. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007.
- White, J. P., Xiong, S., Malvin, N. P., Khoury-Hanold, W., Heuckeroth, R. O., Stappenbeck, T. S., et al. (2018). Intestinal Dysmotility Syndromes following Systemic Infection by Flaviviruses. *Cell* 175, 1198–1212.e12. doi:10.1016/j.cell.2018.08.069.
- Wiertz, E. J., Devlin, R., Collins, H. L., and Rensing, M. E. (2007). Herpesvirus Interference with Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T-Cell Activation. *J. Virol.* 81, 4389–4396. doi:10.1128/JVI.01525-06.
- Wind, M., and Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *BioEssays.* doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200004)22:4<327::AID-BIES3>3.0.CO;2-4.
- Winkler, C. W., Myers, L. M., Woods, T. A., Messer, R. J., Carmody, A. B., McNally, K. L., et al. (2017). Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. *J. Immunol.* 198, 3526–3535. doi:10.4049/jimmunol.1601949.
- Winkler, C. W., and Peterson, K. E. (2018). Using immunocompromised mice to identify mechanisms of Zika virus transmission and pathogenesis. *Immunology* 153, 443–454. doi:10.1111/imm.12883.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri.2016.116.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., et al. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* (80- .). doi:10.1126/science.1229963.
- Wu, S., Majeed, S. R., Evans, T. M., Camus, M. D., Wong, N. M. L., Schollmeier, Y., et al. (2016). Clathrin light chains' role in selective endocytosis influences antibody isotype switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1611189113.

- Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., et al. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov.* 3, 17006. doi:10.1038/celldisc.2017.6.
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., et al. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat. Commun.* 9. doi:10.1038/s41467-017-02816-2.
- Y., L., P., Y., H., L., J., E., and T., W. (2019). IL-33 promotes antiviral immunity and protects against congenital Zika disease in mice. *Eur. J. Immunol.*
- Ye, Q., Liu, Z.-Y., Han, J.-F., Jiang, T., Li, X.-F., and Qin, C.-F. (2016). Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* 43, 43–49. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.004.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., et al. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* doi:10.4049/jimmunol.175.5.2851.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., et al. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* doi:10.1038/ni1087.
- Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., and Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.38.3.1053-1057.2000.
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., et al. (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science (80- )*. 319, 1834–1837. doi:10.1126/science.1153264.
- Zambusi, A., Pelin Burhan, Ö., Di Giaimo, R., Schmid, B., and Ninkovic, J. (2020). Granulins Regulate Aging Kinetics in the Adult Zebrafish Telencephalon. *Cells*. doi:10.3390/cells9020350.
- Zammarchi, L., Tappe, D., Fortuna, C., Remoli, M. E., Günther, S., Venturi, G., et al. (2015). Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. *Eurosurveillance*. doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.23.21153.
- Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., and Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 569–572. doi:10.1590/0074-02760150192.
- Zeng, M. Y., Inohara, N., and Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* 10, 18–26. doi:10.1038/mi.2016.75.
- Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V. L., et al. (2019). Zika virus NS2A-mediated virion assembly. *MBio*. doi:10.1128/mBio.02375-19.
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y. C., Vaughan, R. C., Sankaran, B., et al. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms14762.

- Zhao, C., and Zhao, W. (2020). NLRP3 Inflammasome—A Key Player in Antiviral Responses. *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2020.00211.
- Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T., et al. (2018). Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS 1-caspase-1 axis. *EMBO J.* 37, 1–18. doi:10.15252/embj.201899347.
- Zhou, S. li, Stump, D., Kiang, C. li, Isola, L. M., and Berk, P. D. (1995). Mitochondrial Aspartate Aminotransferase Expressed on the Surface of 3T3-L1 Adipocytes Mediates Saturable Fatty Acid Uptake. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* doi:10.3181/00379727-208-43854.

## 9. Anexos

### I. Comitê de ética para uso de animais:

  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 24 de agosto de 2017.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA CAUSADA PELA INFECÇÃO COM O VÍRUS DA ZIKA EM CAMUNDONGOS", Protocolo n.º 12/2017, sob responsabilidade da Professora Kelly Grace Magalhães foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Camundongo Isogênico C57BL/6 (48 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/03/2017 a 28/02/2019.




  
Prof. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



OPEN **Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice**







Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Lívia Pimentel de Sant'Ana<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Gary P. Kobinger<sup>3,4</sup>, Corinne F. Maurice<sup>5</sup> & Kelly Grace Magalhães 

Gut microbiota composition can modulate neuroendocrine function, inflammation, and cellular and immunological responses against different pathogens, including viruses. Zika virus (ZIKV) can infect adult immunocompetent individuals and trigger brain damage and antiviral responses. However, it is not known whether ZIKV infection could impact the gut microbiome from adult immunocompetent mice. Here, we investigated modifications induced by ZIKV infection in the gut microbiome of immunocompetent C57BL/6J mice. Adult C57BL/6J mice were infected with ZIKV and the gut microbiota composition was analyzed by next-generation sequencing of the V4 hypervariable region present in the bacterial 16S rDNA gene. Our data showed that ZIKV infection triggered a significant decrease in the bacteria belonging to Actinobacteria and Firmicutes phyla, and increased Deferribacteres and Spirochaetes phyla components compared to uninfected mice. Interestingly, ZIKV infection triggered a significant increase in the abundance of bacteria from the Spirochaetaceae family in the gut microbiota. Lastly, we demonstrated that modulation of microbiota induced by ZIKV infection may lead to intestinal epithelium damage and intense leukocyte recruitment to the intestinal mucosa. Taken together, our data demonstrate that ZIKV infection can impact the gut microbiota composition and colon tissue homeostasis in adult immunocompetent mice.



Review

## The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology

Raquel das Neves Almeida <sup>1</sup>, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo <sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos <sup>1</sup>, Rafael Corrêa <sup>1</sup>, Gary P. Kobinger <sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhaes <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, 70910-900 Brasilia, Distrito Federal, Brazil; raquel.unb.bio@gmail.com (R.d.N.A.); heloisa.antoniella@gmail.com (H.A.B.-d.-M.); igorosantosbio@gmail.com (I.d.O.S.); rafaelcorrea31@gmail.com (R.C.)

<sup>2</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada; Gary.Kobinger@crchudequebec.ulaval.ca

<sup>3</sup> Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec-Université Laval, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada

\* Correspondence: kellymagalhaes@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3099-3103

Received: 11 March 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 18 April 2020





**Abstract:** Zika virus (ZIKV) has been reported by several groups as an important virus causing pathological damage in the male reproductive tract. ZIKV can infect and persist in testicular somatic and germ cells, as well as spermatozoa, leading to cell death and testicular atrophy. ZIKV has also been detected in semen samples from ZIKV-infected patients. This has huge implications for human reproduction. Global scientific efforts are being applied to understand the mechanisms related to arboviruses persistency, pathogenesis, and host cellular response to suggest a potential target to develop robust antiviral therapeutics and vaccines. Here, we discuss the cellular modulation of the immunologic and physiologic properties of the male reproductive tract environment caused by arboviruses infection, focusing on ZIKV. We also present an overview of the current vaccine effects and therapeutic targets against ZIKV infection that may impact the testis and male fertility.

**Keywords:** Sertoli cells; Leydig cells; ZIKA virus; arboviruses; infertility

OPEN

## Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells

Heloísa Antoniella Braz-De-Melo <sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Víctor Picolo<sup>3</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>3</sup>, Nathalia Pizato<sup>4</sup> & Kelly Grace Magalhães <sup>1\*</sup>

Zika virus (ZIKV) has a strong tropism for the nervous system and has been related to post-infection neurological syndromes. Once neuronal cells are infected, the virus is capable of modulating cell metabolism, leading to neurotoxicity and cellular death. The negative effect of ZIKV in neuron cells has been characterized. However, the description of molecules capable of reversing these cytotoxic effects is still under investigation. In this context, it has been largely demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid, is highly neuroprotective. Here, we hypothesized that DHA's neuroprotective proprieties could have an influence on ZIKV-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Our data showed that pre-treatment of SH-SY5Y cells with DHA increased the cell viability and proliferation in ZIKV-infected cells. Moreover, DHA triggered an anti-inflammatory response in those infected cells. Besides, DHA was capable of restoring mitochondria function and number in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. In addition, cells pre-treated with DHA prior to ZIKV infection presented a lower viral load at different times of infection. Taking together, these results demonstrated that DHA has a potential anti-inflammatory and neuroprotective effect against ZIKV infection in these neuron-like cells and could be a useful tool in the treatment against this virus.

Gary Kobinger  
Trina Racine *Editors*

# Zika Virus

Methods and Protocols

EXTRAS ONLINE

 Humana Press



## Chapter 7

### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Quantitative Reverse Transcription PCR as a Technique to Analyze Inflammation

Raquel das Neves Almeida, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo,  
Rafael Corrêa, and Kelly Grace Magalhães

#### Abstract

Inflammation is part of a defense reaction of live tissues that is triggered by pathogens, chemical reagents, trauma, and radiation. Understanding the inflammatory process triggered by *Zika virus* (ZIKV) is important to better understand the pathogen-host interactions. The evaluation of this process can be done using tools such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Both techniques have been an indispensable tool not just for immunologists but for all interested in understanding the inflammatory process.

**Key words** Inflammation, ZIKA virus infection, RT-qPCR, ELISA, Antigen, Cytokines, Chemokines

#### 1 Introduction

The testicle is an immune-privileged environment that acts as a blood-testis barrier for the suppression of normal immune responses that could lead to inflammation to protect germ cells from a systemic immune attack [1]. Several infections can break down the testicular homeostasis and impact in the male testicular health, as often observed in some patients infected with Zika virus (ZIKV) [2]. ZIKV infection can modulate the testicular immunity and lead to orchitis, promoting viral replication and persistence and the establishment of the virus in the male reproductive tract [3]. In mice model, ZIKV can infect distinct types of cells in the male reproductive tract, preferentially spermatogonia, primary spermatocytes, and Sertoli cells. Sertoli cells can support high levels of ZIKV replication. In the other cell types, such as spermatogonia, the infection can promote cell death leading to the destruction of seminiferous tubules [4].

### III. Demais publicações:



## Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression

Luis Henrique Corrêa, Rafael Corrêa, Coclita Monizes Farnasso, Livia Pimental de Sant'Ana Dourado and Kelly Grace Magalhães\*

Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Fabrizio Machi,  
Istituto Superiore di Sanità, Italy

#### Reviewed by:

Carlos Alfaro,  
Universidad de Navarra, Spain  
Zong Qing Guo,  
Harvard University,  
United States

#### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymag@unb.br

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Immunity  
and Immunotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 05 July 2017

Accepted: 20 August 2017

Published: 19 September 2017

#### Citation:

Corrêa LH, Corrêa R, Farnasso CM,  
de Sant'Ana Dourado LP and  
Magalhães KG (2017) Adipocytes  
and Macrophages Interplay in the  
Orchestration of Tumor  
Microenvironment: New Implications  
in Cancer Progression.  
Front. Immunol. 8:1129.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01129

Inflammation has been known as one of the main keys to the establishment and progression of cancers. Chronic low-grade inflammation is also a strategic condition that underlies the causes and development of metabolic syndrome and obesity. Moreover, obesity has been largely related to poor prognosis of tumors by modulating tumor microenvironment with secretion of several inflammatory mediators by tumor-associated adipocytes (TAAs), which can modulate and recruit tumor-associated macrophages. Thus, the understanding of cellular and molecular mechanisms that underlay and link inflammation, obesity, and cancer is crucial to identify potential targets that interfere with this important route. Knowledge about the exact role of each component of the tumor microenvironment is not yet fully understood, but the new insights in literature highlight the essential role of adipocytes and macrophages interplay as key factor to determine the fate of cancer progression. In this review article, we focus on the functions of adipocytes and macrophages orchestrating cellular and molecular mechanisms that lead to inflammatory modulation in tumor microenvironment, which will be crucial to cancer establishment. We also emphasized the mechanisms by which the tumor promotes itself by recruiting and polarizing macrophages, discussing the role of adipocytes in this process. In addition, we discuss here the newest possible anticancer therapeutic treatments aiming to retard the development of the tumor based on what is known about cancer, adipocyte, and macrophage polarization.

**Keywords:** adipocytes, cancer, tumor microenvironment, obesity, inflammation, tumor-associated macrophages, tumor-associated adipocytes, macrophage polarization

### INTRODUCTION

#### The Tumor Microenvironment

Tumor is not composed only of the cancer cells. Instead, there is a dynamic and mutualist relationship between tumor cells and the surrounding stroma (1). Studies have shown an intimate relationship between tumor mass cells and their extracellular matrix correlating this interaction with cancer establishment, progression, and metastasis. The extracellular matrix is responsible not only for the structural support of the cells but also for storing important signaling molecules, such as chemokines (2).



## Schistosomal Lipids Activate Human Eosinophils via Toll-Like Receptor 2 and PGD<sub>2</sub> Receptors: 15-LO Role in Cytokine Secretion

Kelly G. Magalhães<sup>1,2</sup>, Tatiana Luna-Gomes<sup>3,4</sup>, Fabio Mosquito-Santos<sup>3,5</sup>, Rafael Cordeiro<sup>2</sup>, Leonardo Santos Assunção<sup>1</sup>, Geórgia Correa Atalla<sup>6</sup>, Peter F. Walker<sup>7</sup>, Christiane Bandeira-Melo<sup>2#</sup> and Patricia T. Bozza<sup>1#</sup>

### OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Thiago Almeida Pereira,  
Stanford University, United States

**Reviewed by:**  
Cecilia Teixeira Brandt,  
Federal University of Pernambuco,  
Brazil  
Dionísio Chiburno Menezes,  
Biomedical Research Institute (IRB),  
United States  
Pedro H. Gazzanelli-Guimarães,  
National Institute of Allergy and  
Infectious Diseases (NIAID),  
United States

**\*Correspondence:**  
Christiane Bandeira-Melo  
cband@ibicb.usp.br  
Patricia T. Bozza  
pbozza@icb.usp.br

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work and are senior  
authors

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 01 October 2018  
**Accepted:** 21 December 2018  
**Published:** 25 January 2019

**Citation:**  
Magalhães KG, Luna-Gomes T,  
Mosquito-Santos F, Cordeiro R,  
Assunção LS, Atalla GC, Walker PF,  
Bandeira-Melo C and Bozza PT (2019)  
Schistosomal Lipids Activate Human  
Eosinophils via Toll-Like Receptor 2  
and PGD<sub>2</sub> Receptors: 15-LO Role in  
Cytokine Secretion.  
Front. Immunol. 9:2161.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.02161

<sup>1</sup> Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup> Laboratório Imunologia e Infecção, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, <sup>3</sup> Laboratório de Infecção, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup> Departamento de Ciências da Nutrição, Instituto de Aplicação Fernando Rodrigues de Góes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>5</sup> Laboratório de Pesquisa em Análises Clínicas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>6</sup> Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>7</sup> Allergy and Immunology, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

Parasite-derived lipids may play important roles in host-pathogen interactions and immune evasion mechanisms. Remarkable accumulation of eosinophils is a characteristic feature of inflammation associated with parasitic disease, especially caused by helminths. Infiltrating eosinophils are implicated in the pathogenesis of helminth infection by virtue of their capacity to release an array of tissue-damaging and immunoregulatory mediators. However, the mechanisms involved in the activation of human eosinophils by parasite-derived molecules are not clear. Here we investigated the effects and mechanisms of schistosomal lipids-induced activation of human eosinophils. Our results showed that stimulation of human eosinophils *in vitro* with total lipid extracts from adult worms of *S. mansoni* induced direct activation of human eosinophils, eliciting lipid droplet biogenesis, synthesis of leukotriene (L) C<sub>4</sub> and eosin (EX) C<sub>4</sub> (14,15 LTC<sub>4</sub>) and secretion of eosinophil pre-formed TGFβ. We demonstrated that main eosinophil activating components within *S. mansoni* lipid extract are schistosomal-derived lysophosphatidylcholine (LPC) and prostaglandin (PG)D<sub>2</sub>. Moreover, TLR2 is up-regulated in human eosinophils upon stimulation with schistosomal lipids and pre-treatment with anti-TLR2 inhibited both schistosomal lipids- and LPC-, but not PGD<sub>2</sub>-, induced lipid droplet biogenesis and EXC<sub>4</sub> synthesis within eosinophils, indicating that TLR2 mediates LPC-driven human eosinophil activation. By employing PGD<sub>2</sub> receptor antagonists, we demonstrated that DP1 receptors are also involved in various parameters of human eosinophil activation induced by schistosomal lipids, but not by schistosomal LPC. In addition, schistosomal lipids and their active components PGD<sub>2</sub> and LPC, triggered 15-LO dependent production of EXC<sub>4</sub> and secretion of TGFβ. Taken together, our results showed that schistosomal lipids contain at least two components—LPC and PGD<sub>2</sub>—that are capable of direct activation of human eosinophils acting on distinct eosinophil-expressed receptors, noticeably TLR2 as well as DP1, trigger human eosinophil activation characterized by production/secretion of pro-inflammatory and immunoregulatory mediators.

**Keywords:** eosinophil, PGD<sub>2</sub>, lipids, schistosoma, TLR, LPC, TGFβ, eosin

## RESEARCH ARTICLE

# Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity

Guilherme D. Brand<sup>1\*</sup>, Marcelo H. S. Ramada<sup>2,3,4</sup>, Júlia R. Manickchand<sup>1</sup>, Rafael Correa<sup>5</sup>, Dailla J. S. Ribeiro<sup>6</sup>, Michele A. Santos<sup>7</sup>, Andream G. Vasconcelos<sup>7</sup>, Fernando Y. Abrão<sup>8</sup>, Maura V. Prates<sup>8</sup>, André M. Murad<sup>8</sup>, José L. Cardozo FH<sup>9,10</sup>, José Roberto S. A. Leite<sup>9</sup>, Kelly G. Magalhães<sup>9</sup>, Aline L. Oliveira<sup>9</sup>, Carlos Bloch, Jr.<sup>9</sup>

**1** Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, LSAB, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Geriatria, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **4** Laboratório de Espectrometria de Massa, LEM, Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil, **5** Laboratório de Imunologia e Infecção, UMI, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **6** Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, UFMN, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **7** Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NUPMA, Faculdade de Medicina, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, **8** Faculdade de Farmácia, Faculdade de Ciências, Goiânia, GO, Brazil, **9** Departamento de Fitopatologia, Instituto Mato-Grossense de Algodão, Primavera do Leste, MT, Brazil



## OPEN ACCESS

**Citation:** Brand GD, Ramada MHS, Manickchand JR, Correa R, Ribeiro DJS, Santos MA, et al. (2019) Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. *PLoS ONE* 14(8): e0220658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220658>

**Editor:** José de Moraes, Universidade Guarulhos, BRAZIL

**Received:** June 10, 2019

**Accepted:** July 19, 2019

**Published:** August 8, 2019

**Copyright:** © 2019 Brand et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

**Funding:** This work was supported by: QDS - Fundação de Amparo à Pesquisa do DF (FAP-DF, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220658>) grant 0193.000869/2015; ALO - Fundação de Amparo à Pesquisa do DF (FAP-DF, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220658>) grant 0193.001588/2017; MAS - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220658>).

\* [gbrand@unb.br](mailto:gbrand@unb.br)

## Abstract

Following the trends of our previous works on the unveiling of bioactive peptides encrypted in plant proteins from diverse species, the present manuscript reports the occurrence of four proof-of-concept intragenic antimicrobial peptides in human proteins, named Hs IAPs. These IAPs were prospected using the software Kamal, synthesized by solid phase chemistry, and had their interactions with model phospholipid vesicles investigated by differential scanning calorimetry and circular dichroism. Their antimicrobial activity against bacteria, yeasts and filamentous fungi was determined, along with their cytotoxicity towards erythrocytes. Our data demonstrates that Hs IAPs are capable to bind model membranes while attaining  $\alpha$ -helical structure, and to inhibit the growth of microorganisms at concentrations as low as 1  $\mu$ M. Hs02, a novel sixteen residue long internal peptide (KWAVRIIRKKFKIPGIS-NH<sub>2</sub>) derived from the unconventional myosin 1h protein, was further investigated in its capacity to inhibit lipopolysaccharide-induced release of TNF- $\alpha$  in murine macrophages. Hs02 presented potent anti-inflammatory activity, inhibiting the release of TNF- $\alpha$  in LPS-primed cells at the lowest assayed concentration, 0.1  $\mu$ M. A three-dimensional solution structure of Hs02 bound to DPC micelles was determined by Nuclear Magnetic Resonance. Our work exemplifies how the human genome can be mined for molecules with biotechnological potential in human health and demonstrates that IAPs are actual alternatives to antimicrobial peptides as pharmaceutical agents or in their many other putative applications.



## Lysophosphatidylcholine Induces NLRP3 Inflammasome-Mediated Foam Cell Formation and Pyroptosis in Human Monocytes and Endothelial Cells

Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Luis Felipe Fonseca Silva<sup>1</sup>, Dalila Juliana Silva Ribeiro<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Luis Henrique Corrêa<sup>1</sup>, Livia Pimental de Sant'Ana<sup>1</sup>, Leonardo Santos Assunção<sup>2</sup>, Patricia T. Bozza<sup>2</sup> and Kely Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Immunopharmacology, Institute of Oswaldo Cruz—Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Guochang Hu,  
University of Illinois at Chicago,  
United States

#### Reviewed by:

Masuda Kamezaki,  
Case Western Reserve University,  
United States  
Senthilvelay Jay Jagannathan,  
Louisiana State University,  
United States

#### \*Correspondence:

Kely Grace Magalhães  
kelymagalhães@unb.br

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 17 July 2019

Accepted: 28 November 2019

Published: 09 January 2020

#### Citation:

Corrêa R, Silva LFF, Ribeiro DJR,  
Almeida RN, Santos IG, Corrêa LH,  
Sant'Ana LP, Assunção LS, Bozza PT  
and Magalhães KG (2020)  
Lysophosphatidylcholine Induces  
NLRP3 Inflammasome-Mediated  
Foam Cell Formation and Pyroptosis  
in Human Monocytes and Endothelial  
Cells. *Front. Immunol.* 10:2627.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.02627

Foam cells are specialized lipid-loaded macrophages derived from monocytes and are a key pathological feature of atherosclerotic lesions. Lysophosphatidylcholine (LPC) is a major lipid component of the plasma membrane with a broad spectrum of proinflammatory activities and plays a key role in atherosclerosis. However, the role of LPC in lipid droplet (LD) biogenesis and the modulation of inflammasome activation is still poorly understood. In the present study, we investigated whether LPC can induce foam cell formation through an analysis of LD biogenesis and determined whether the cell signaling involved in this process is mediated by the inflammasome activation pathway in human endothelial cells and monocytes. Our results showed that LPC induced foam cell formation in both types of cells by increasing LD biogenesis via a NLRP3 inflammasome-dependent pathway. Furthermore, LPC induced pyroptosis in both cells and the activation of the inflammasome with IL-1 $\beta$  secretion, which was dependent on potassium efflux and lysosomal damage in human monocytes. The present study described the IL-1 $\beta$  secretion and foam cell formation triggered by LPC via an inflammasome-mediated pathway in human monocytes and endothelial cells. Our results will help improve our understanding of the relationships among LPC, LD biogenesis, and NLRP3 inflammasome activation in the pathogenesis of atherosclerosis.

**Keywords:** lysophosphatidylcholine, foam cells, lipid droplet, inflammasome, NLRP3, atherosclerosis

### INTRODUCTION

Atherosclerosis is caused by a proinflammatory process (1) mediated by the deposition of excess lipids in the arterial intima (2), resulting in the development of lesions in the arterial walls. These atherosclerotic lesions are fibro-fatty plaques in the intima of arteries (3) characterized by abundant cells with multiple lipid droplets (LDs) in the cytoplasm. Owing to this foamy morphology, these enhanced LD-containing cells are called foam cells. Foam cells are fundamental components of the establishment and progression of atherosclerosis and leukocyte recruitment to the site of



## Absence of the Caspases 1/11 Modulates Liver Global Lipid Profile and Gut Microbiota in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice

Livia Pimental de Sant'Ana<sup>1\*</sup>, Dalila Juliana S. Ribeiro<sup>1\*</sup>, Aline Maria Araújo Martins<sup>2</sup>, Fábio Neves dos Santos<sup>3</sup>, Rafael Corrêa<sup>4</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Marcos Nogueira Ebarim<sup>4</sup>, Corinne F. Maurice<sup>5</sup> and Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>CEMIBIO—Centro de Meliobiotica y Biomédica, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas—UNICAMP, São Paulo, Brazil, <sup>4</sup>Department of Chemistry, McMaster University, São Paulo, Brazil, <sup>5</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC, Canada

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Ribeiro D. Cruz,  
Federal University of Ceará, Brazil

#### Reviewed by:

Zhenqiang Wen,  
Columbia University, United States  
Lucas Francisco Ribeiro do  
Nascimento,  
Ministry of Health, Brazil

#### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymagalhães@unb.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

#### †CORRESPONDENCE

Kelly Grace Magalhães  
orcid.org/0000-0002-7435-5272

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Nutritional Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 26 June 2019

Accepted: 20 November 2019

Published: 09 January 2020

#### Citation:

Sant'Ana LP, Ribeiro DJ, Martins AM, dos Santos FN, Corrêa R, Almeida RN, Ebarim MN, Maurice CF and Magalhães KG (2020) Absence of the Caspases 1/11 Modulates Liver Global Lipid Profile and Gut Microbiota in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. *Front. Immunol.* 10:2626. doi: 10.3389/fimmu.2019.02626

Obesity is a chronic disease with rising worldwide prevalence and largely associated with several other comorbidities, such as cancer, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and metabolic syndrome. Hepatic steatosis, a hallmark of NAFLD, is strongly correlated with obesity and has been correlated with changes in the gut microbiota, which can promote its development through the production of short-chain fatty acids (SCFAs) that regulate insulin resistance, bile acid, choline metabolism, and inflammation. Recent studies have suggested a controversial role for the inflammasome/caspase-1 in the development of obesity and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Here, we evaluated the role of inflammasome NLRP3 and caspases 1/11 in the establishment of obesity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice, correlating them with the global lipid profile of the liver and gut microbiota diversity. After feeding wild-type, caspases 1/11, and NLRP3 knockout mice with a standard fat diet (SFD) or a high-fat diet (HFD), we found that the caspases 1/11 knockout mice, but not NLRP3 knockout mice, were more susceptible to HFD-induced obesity, and developed enhanced hepatic steatosis even under SFD conditions. Lipidomics analysis of the liver, assessed by MALDI-MS analysis, revealed that the HFD triggered a significant change in global lipid profile in the liver of WT mice compared to those fed an SFD, and this profile was modified by the lack of caspases 1/11 and NLRP3. The absence of caspases 1/11 was also correlated with an increased presence of triacylglycerol in the liver. Gut microbial diversity analysis, using 16S rRNA gene sequencing, showed that there was also an increase of Proteobacteria and a higher Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut of caspases 1/11 knockout mice fed an HFD. Overall, mice without caspases 1/11 harbored gut bacterial phyla involved with weight gain, obesity, and hepatic steatosis. Taken together, our data suggest an important role for caspases 1/11 in the lipid composition of the liver and in the modulation of the gut microbial community composition. Our results further suggest that HFD-induced obesity and the absence of caspases 1/11 may regulate both lipid metabolism and gut microbial diversity, and therefore may be associated with NAFLD and obesity.

**Keywords:** obesity, gut microbiota, high-fat diet, NAFLD, inflammasome